



Liposomes thermosensibles furtifs pour l'administration du 5-Fluorouracile déclenchée par ultrasons

Chantal Al Sabbagh

► To cite this version:

Chantal Al Sabbagh. Liposomes thermosensibles furtifs pour l'administration du 5-Fluorouracile déclenchée par ultrasons. Pharmacie galénique. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA114819 . tel-01138461

HAL Id: tel-01138461

<https://theses.hal.science/tel-01138461>

Submitted on 2 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE :

Pharmacotechnie et Biopharmacie

ANNÉE 2013 - 2014

SÉRIE DOCTORAT N° 1281

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 26/09/2014

par

M^{elle} Chantal AL SABBAGH

**Liposomes thermosensibles furtifs pour l'administration du
5-Fluorouracile déclenchée par ultrasons**

Directeur de thèse : Elias FATTAL
Co-directeur de thèse : Nicolas TSAPIS

Pr. (UMR CNRS 8612)
C.R. (UMR CNRS 8612)

Composition du jury :

Présidente du jury : Odile CHAMBIN
Rapporteurs : Béatrice HEURTAULT
Karine ANDRIEUX
Examineurs : Odile CHAMBIN

Pr. (EMMA EA 581)
M.C.U.-H.D.R. (UMR CNRS/UDS 7199)
Pr. (UMR CNRS 8258 Inserm U1022)
Pr. (EMMA EA 581)

”لَأَنَّ مَنْ أَحَبَّ الْحَيَاةَ بِالْعَمَلِ النَّافِعِ تَفَتَّحَ لَهُ الْحَيَاةُ أَعْمَاقُهَا ، وَ تُدْنِيهِ مِنْ أَبْعَدِ أَسْرَارِهَا .“

جـ-بران خليل جـ-بران

« Et aimer la vie par le labeur est devenir intime avec le plus profond secret de la vie. »

Gibran Khalil Gibran (Le Prophète, chapitre 6)

A ma mère Bernadette et à mon père Georges

Je remercie chaleureusement le Pr Elias FATTAL, mon enseignant en master et mon directeur de thèse. Un grand merci pour son accueil dans l'équipe des « Fragiles » et les discussions scientifiques tout au long de ce travail de thèse. Le laboratoire fut réellement ma deuxième maison.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance au Dr Nicolas TSAPIS pour son enthousiasme, sa rigueur et son encadrement pendant ces années de thèse. Merci pour sa grande disponibilité et ses compétences scientifiques et managériales.

Je remercie vivement ma très chère Université Libanaise pour m'avoir offert l'opportunité de poursuivre mes études en pharmacie par une thèse de doctorat. Une pensée particulière au Pr Marie TUENI qui est partie très tôt après s'être donnée à la faculté de Pharmacie. Je souhaite également remercier le Pr Ahmad YASSINE pour son soutien au cours de ces années d'études.

Je tiens à remercier le Dr Béatrice HEURTAULT, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail.

Je remercie le Pr Karine ANDRIEUX pour m'avoir tout d'abord enseigné en master, et pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je remercie le Pr Odile CHAMBIN pour avoir fait le grand honneur de participer à mon jury, en tant qu'examineur.

Je remercie également Valérie DOMERGUE ainsi que tout le personnel de l'animalerie pour leur aide précieuse pour les expériences chez la souris.

Je tiens à remercier sincèrement les nombreuses personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Tout d'abord au sein de l'Institut Galien Paris-Sud :

Le Dr Claire GUEUTIN qui m'a beaucoup aidée au cours de ces années, avec de longues discussions que j'ai beaucoup appréciées. Merci pour ton expertise scientifique en chromatographie liquide haute performance ainsi que pour ta disponibilité.

Hélène CHACUN et Stéphanie DENIS pour leur expertise scientifique en radioactivité et manipulation des produits à risque, et en culture cellulaire, respectivement.

Le Pr Amélie BOCHOT, les Dr Juliette VERGNAUD et Hervé HILLAIREAU pour les discussions scientifiques qu'on a pu avoir.

Equipe des « Fragiles » : Amélie DUFAY WOJCICKI, Adam BOHR, Alain NGUESSAN, Christian RUGE, Dinh Duy PHAM, Giovanna GIACALONE, Ludivine MOUSNIER, Mathilde LORSCHIEDER, Naïla EL KECHAI, Nathalie MENARD, Odile DIOU, Régina REUL, Romain CANIONI, Rosana SIMON-VAZQUEZ, Rym SKANJI, Tanguy BOISSENOT, Thais LEITE NASCIMENTO et Walhan ALSHAER. Merci à tous ces moments passés ensemble, dans ce bureau jamais vide, au restaurant universitaire, au labo, à Paris... Merci pour m'avoir offert votre amitié et votre soutien qui m'ont permis d'affronter les difficultés de la thèse.

Patricia CALLEJA-GONZALES pour son aide précieuse pour les études de pharmacocinétique chez la souris.

Mais aussi Alice GAUDIN, Davide BRAMBILLA, Dunja SOBOT, Gopan GOPALAKRISHNAN, Moritz BECK-BROICHSITTER, Nadège HANDKE, Nadia ABED, Valentina AGOSTONI, que j'ai eu le grand plaisir de rencontrer.

Un grand merci à Andrey MAXIMENKO qui m'a introduite dans le monde de l'expérimentation chez l'animal de laboratoire.

Merci à Donato COSCO pour les discussions scientifiques lors de son séjour au laboratoire, qui ont nourri ma recherche.

Toute l'équipe administratrice et informatique : Marie-Claude ANMELLA, Anthony PENSEL, Christian DUCAS, Fatiha HAMZA, Patricia LIVET, Sylvie ZEMMOUR. Spécialement, Dominique MARTIN pour son sourire quotidien.

Je remercie également l'équipe de Tours avec qui j'ai eu la chance de collaborer : Ayache BOUAKAZ, Anthony NOVELL et Jean-Michel ESCOFFRE et leurs précieux ultrasons (Imagerie et Cerveau UMR U 930).

J'ai une pensée vers mes amis : Amani CHAMS, Amani SABRA et Oucèma KARAM pour leur gentillesse et leur amitié.

Une pensée toute particulière pour Claudio PALAZZO pour avoir été à mes côtés pendant les deux dernières années de thèse, m'avoir soutenue et encouragée.

Gardons le meilleur pour la fin, je souhaiterais remercier ma famille, en particulier mes parents, mes frères et sœurs, mes nièces et neveux et tous ceux à venir !, et mes grands-parents, bien plus que ne peuvent en dire ces quelques mots. Maman, papa, vous êtes mes idoles, vous m'avez élevée ainsi et c'est grâce à vous que je suis où je suis aujourd'hui.

Sommaire

Abréviations / Abbreviations	12
Liste des figures	15
Travaux antérieurs.....	15
Liste des tableaux.....	18
Travaux antérieurs.....	18
Introduction générale.....	20
Références	23
Travaux antérieurs.....	26
1. Généralités sur les liposomes	26
1.1. Liposomes : de la molécule amphiphile à la vésicule	26
1.2. Liposomes comme vecteur de molécules actives.....	27
1.3. Principe de la préparation des liposomes	28
1.4. Différentes classes de liposomes.....	29
2. Liposomes de 1 ^{ère} génération	30
2.1. Définition	30
2.2. Stabilité.....	30
2.3. Cinétique de libération des molécules actives.....	30
2.4. Devenir des liposomes de 1 ^{ère} génération après administration intraveineuse.....	32
3. Liposomes de 2 ^{ème} génération	33
3.1. Définition	33
3.2. Méthode d'insertion des lipopolymères à base de PEG	34
3.3. Mécanisme d'action et propriétés pharmacocinétiques	36
3.4. Accumulation tumorale par effet EPR	38
3.5. Contribution de l'effet EPR au ciblage passif des tumeurs.....	38
3.6. Avantages et inconvénients des liposomes Stealth®	42
4. Liposomes de 3 ^{ème} génération	44
4.1. Définition	44
4.2. Approches du ciblage actif.....	45
5. Liposomes thermosensibles.....	47
5.1. Pertinence des liposomes thermosensibles en oncologie	47
5.2. Transition de phase gel-cristal liquide L _β - L _α : isomérisation <i>trans-gauche</i>	48
5.3. Lipides utilisés pour la formulation de liposomes thermosensibles.....	50
5.3.1. 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine.....	51
5.3.2. 3β-Hydroxy-5-cholestène ou cholestérol	51
5.3.3. 1,2-distéaroyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-éthoxy(polyéthylène glycol)-2000].....	53

5.3.4. Lysolipides	55
5.4. Intérêt des liposomes thermosensibles contenant un lysolipide versus les liposomes thermosensibles traditionnels	57
6. Libération active à partir de liposomes thermosensibles	60
6.1. Méthodes d'induction de l'hyperthermie	60
6.2. Effet direct de l'hyperthermie	63
6.3. Activation de la libération d'agents anticancéreux par l'hyperthermie	64
6.4. Limites de l'hyperthermie	65
7. 5-Fluorouracile	66
7.1. Mécanisme d'action du 5-Fluorouracile	66
7.2. Principales indications du 5-FU	68
7.3. Principales toxicités du 5-FU	69
7.4. Intérêt de l'encapsulation du 5-FU dans des vecteurs colloïdaux	70
7.5. Vectorisation du 5-FU par les liposomes	71
8. Conclusion.....	73
Références	78
Introduction	93
Chapitre 1 :	96
Evaluation <i>in vitro</i> des effets thermique et mécanique des ultrasons focalisés sur la libération de calceïne à partir de liposomes thermosensibles.....	96
1. Introduction	100
2. Materials and methods	102
2.1. Materials.....	102
2.2. Liposome preparation and calcein encapsulation.....	102
2.3. Dynamic light scattering	103
2.4. Differential scanning calorimetry (DSC)	103
2.5. Cholesterol-dependent calcein release	103
2.6. <i>In vitro</i> FUS setup and experimental settings	104
2.7. Activation protocol.....	105
2.8. Cryo-transmission electron microscope (cryo-TEM) sample preparation	106
2.9. Statistical analysis	106
3.1. Preparation, characterization and optimization of liposomes	106
3.2. DSC	107
3.3. Calcein leakage from liposomes	109
3.4. Ultrasound-induced hyperthermia.....	109
3.5. <i>In vitro</i> calcein release.....	111
3.6 Influence of the thermal effect on the size of liposomes.....	113
4. Discussion.....	114
5. Conclusions	117

Acknowledgements	118
Declaration of interest statement.....	118
Supplementary figure	118
Références	119
Chapitre 2 :	125
Optimisation de liposomes thermosensibles furtifs de 5-Fluorouracile pour la délivrance déclenchée par ultrasons.....	125
Résumé.....	126
Abstract	128
1. Introduction	129
2. Materials and methods	131
2.1. Materials.....	131
2.2. 5-FU liposomes	131
2.2.1. 5-FU-loaded liposomes preparation.....	131
2.2.2. HPLC determination of 5-FU.....	132
2.3. Determination of phospholipid concentration.....	132
2.4. Determination of encapsulation efficacy and drug:lipid ratio.....	133
2.5. 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes.....	133
2.5.1. Copper and polyethylenimine concentrations optimization.....	133
2.5.2. Cu-PEI hydration solution.....	133
2.5.3. 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes preparation.....	133
2.5.4. 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes characterization	134
2.5.5. Determination of encapsulated Cu-PEI complex	134
2.6. Dynamic light scattering	134
2.7. <i>In vitro</i> temperature-dependent drug release from liposomes.....	135
2.8. Cells and cell culture	136
2.9. Statistical analysis	137
3. Results	137
3.1. Physicochemical characterization of liposomes.....	137
3.2. 5-FU encapsulation efficacy.....	138
3.3. Temperature-dependent 5-FU release from 5-FU-loaded liposomes.....	139
3.4. Copper and polyethylenimine concentrations optimization and liposome formulation	139
3.5. Preparation and physicochemical characterization of liposomes.....	141
3.6. 5-FU active encapsulation into Cu-PEI-loaded liposomes	142
3.7. <i>In vitro</i> temperature-dependent 5-FU release from 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes	144
3.8. Cytotoxicity.....	146
4. Discussion	148

5. Conclusion.....	152
Acknowledgments	153
Supplementary figures.....	153
Références	154
Chapitre 3 :	159
Pharmacocinétique et biodistribution de liposomes furtifs thermosensibles et non thermosensibles encapsulant le 5-Fluorouracile sous forme d'un complexe ternaire avec le cuivre et la polyéthylèneimine	159
Résumé	160
Abstract	162
1. Introduction	163
2. Materials and methods	164
2.1. Materials	164
2.2. 5-FU-loaded liposomes preparation	164
2.3. Physico-chemical characterization of 5-FU-loaded liposomes	165
2.4. Animals and tumor model	166
2.5. Pharmacokinetic study in tumor-bearing mice.....	167
2.6. Biodistribution study in tumor-bearing mice	167
2.7. Pharmacokinetics evaluation	168
2.8. Statistical analysis	168
3. Results and discussion.....	169
3.1. Formulation and characterization of 5-FU-TSLS and 5-FU-NTSLs	169
3.2. Pharmacokinetics of 5-FU	170
3.3. Biodistribution of 5-FU	173
4. Conclusion.....	177
Acknowledgments	178
Références	179
Encapsulation du 5-FU par la technique de congélation/décongélation	183
1. Introduction	183
2. Matériel et méthodes	184
2.1. Matériels	184
2.2. Préparation des liposomes par la technique de C/D	184
2.3. Détermination de la taille des liposomes.....	185
2.4. Détermination de l'EE du 5-FU	185
3. Résultats et discussion	185
4. Conclusion.....	187
Stabilité au gradient osmotique de l'encapsulation du complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI	188
1. Introduction	188
2. Matériel et méthodes	189

2.1. Matériels	189
2.2 Mesure de l'osmolalité	189
2.3. Préparation des 5-FU-LTST et des 5-FU-LNTS	190
2.4. Essais de libération à la dilution.....	190
3. Résultats et discussion	190
4. Conclusion	194
Références	195
Discussion générale.....	198
1. Contexte	198
2. Formulation de liposomes thermosensibles traditionnels et de liposomes non thermosensibles et son impact sur la thermosensibilité	200
3. Efficacité d'encapsulation et rétention du 5-FU à l'intérieur des liposomes thermosensibles traditionnels et de liposomes non thermosensibles	202
4. Libération du 5-FU déclenchée par les ultrasons focalisés	211
5. Devenir des 5-FU-LTST et des 5-FU-LNTS <i>in vivo</i>	214
Références	217
Conclusions et perspectives	222
Références	226
Annexe	228
Références.....	229

Abréviations / Abbreviations

AUC	: Aire sous la courbe / Area under curve
BD	: Biodistribution
C/D	: Congélation/décongélation / Freeze/thaw
CHOL	: Cholestérol / Cholesterol
CI ₅₀ / IC ₅₀	: Concentration inhibitrice médiane / Half maximal inhibitory concentration
CLHP / HPLC	: Chromatographie liquide haute performance / High performance liquid Chromatography
CMA	: Champ magnétique alternatif / Alternating magnetic field
C _{max}	: Pic de concentration plasmatique / Plasmatic peak concentration
cryo-TEM	: Cryo-microscopie électronique à transmission / Cryogenic transmission electron microscopy
Cu-PEI	: Complexe cuivre-polyéthylèneimine / Copper-polyethylenimine complex
DC	: Rapport cyclique / Duty cycle
DCP	: Dicétylphosphate / Dicetylphosphate
d _H	: Diamètre hydrodynamique / Hydrodynamic diameter
DLS	: Diffusion quasi-élastique de la lumière / Dynamic light scattering
DMPE-PEG	: 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-PEG / 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-PEG
DPD	: Dihydropyrimidine déshydrogénase / Dihydropyrimidine dehydrogenase
DPPC	: 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine / 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPPGOG	: 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphoglycéroglycérol / 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglyceroglycerol
DSC	: Calorimétrie différentielle à balayage / Differential scanning calorimetry
DSPC	: 1,2-distéaroyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine / 1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DSPE-PEG ₂₀₀₀	: 1,2-distéaroyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-PEG ₂₀₀₀ / 1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-PEG ₂₀₀₀
ECG	: Electrocardiogramme / Electrocardiogram
EDTA	: Acide éthylène diamine tétraacétique / Ethylenediaminetetraacetic acid
EE	: Efficacité d'encapsulation / Encapsulation efficacy
EGF	: Facteur de croissance épidermique / Epidermal growth factor
EPC	: Mélange dont le composé majoritaire est le L- α -phosphatidylcholine
EPR	: Perméabilité et rétention accrue / Enhanced permeation and retention
FBAL	: α -Fluoro- β -alanine
FBS	: Sérum de veau fœtal / Foetal bovine serum
FDA	: Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux / Food and drug administration
FdUMP	: Fluorodéoxyuridine monophosphate / Fluorodeoxyuridine monophosphate
FdUTP	: Fluorodéoxyuridine triphosphate / Fluorodeoxyuridine triphosphate
FUS	: Ultrasons focalisés / Focused ultrasound
FUTP	: Fluorouridine triphosphate / Fluorouridine triphosphate

G	: Accélération de la pesanteur / Gravitational acceleration
HDL	: Lipoprotéines de haute densité / High density lipoproteins
HEPES	: Tampon d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique / 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid buffer
HFL	: Hydratation du film lipidique / Lipid film hydration
HIFU	: Ultrasons focalisés de haute intensité / High intensity focused ultrasound
(HPEI) ⁺	: PEI protonée / Protonated PEI
HSPC	: phosphatidylcholine hydrogénée de soja : Hydrogenated soy phosphatidylcholine
HT	: Hyperthermie / Hyperthermia
IV	: Voie intraveineuse / Intravenous route
LD	: Etat liquide désordonné / Liquid-disordered state
LNTS / NTSLs	: Liposomes non thermosensibles / Non thermosensitive liposomes
LO	: Etat liquide ordonné / Liquid-ordered state
LTS / TSLs	: Liposomes thermosensibles / Thermosensitive liposomes
LTSL / LTSLs	: Liposomes thermosensibles contenant un lysolipide / Low temperature sensitive liposomes
LTST / TTSLs	: Liposomes thermosensibles traditionnels / Traditional thermosensitive liposomes
LUV	: Vésicules unilamellaires de grande taille / Large unilamellar vesicles
L _α	: Phase lamellaire cristal liquide / Lamellar liquide cristalline phase
L _β '	: Phase lamellaire gel / Lamellar gel phase
MEC	: Matrice extracellulaire / Extracellular matrix
MLV	: Vésicules multilamellaires / Multilamellar vesicles
MM / MW	: Masse molaire / Molecular weight
MPPC	: 1-palmitoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine / 1-palmitoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
MSPC	: 1-stéaroyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine / 1-stearoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
MTS	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MVV	: Vésicules multivésiculaires / Multivesicular vesicles
OLV	: Vésicules oligolamellaires / Oligolamellar vesicles
OPRT	: Orotate phosphoribosyl transférase / Orotate phosphoribosyltransferase
P	: Paramètre d'empilement / Packing parameter
PA	: Principe actif / Active drug
PBS	: Tampon phosphate salin / Phosphate buffer saline
PDI	: Indice de polydispersité / Polydispersity index
PEG ₂₀₀₀	: Polyéthylène glycol 2 kDa / Polyethylen glycol 2 kDa
PEI	: Polyéthylèneimine, éthylènediamine branchée / Polyethylenimine, ethylenediamine branched
PIR	: Proche infrarouge / Near infrared
PK	: Pharmacocinétique / Pharmacokinetics
PNP	: Pic de pression négative / Peak negative pressure
P _{oct/eau}	: Coefficient de partage n-octanol/eau / Partition coefficient n-octyl alcohol/water
PPE	: Erythrodysesthésie palmo-plantaire / Palmar-plantar erythrodysesthesia
PRF	: Fréquence de répétition des impulsions / Pulse repetition frequency

psi	: Livre par pouce carré / Pound per square inch
P _β	: Phase lamellaire ondulée / Lamellar ripple phase
RGD	: Arginine-glycine-acide aspartique / Arginylglycylaspartic acid
RR	: Ribonucléotide réductase / Ribonucleotide reductase
SO	: Etat solide ordonné / Solid-ordered state
SPM / RES	: Système des phagocytes mononucléés / Reticuloendothelial system
SUV	: Vésicules unilamellaires de petite taille / Small unilamellar vesicles
t _{1/2α}	: Demi-vie de distribution / Distribution half-life
t _{1/2β}	: Demi-vie d'élimination / Elimination half-life
TGF-β	: Facteur de croissance de transformation β / Transforming growth factor β
T _m	: Température de transition de phase / Phase transition temperature
T _{max}	: Temps correspondant au pic de concentration plasmatique / Time corresponding to plasmatic peak concentration
TNF-α	: Facteur de nécrose tumorale α / Tumor necrosis factor α
TS	: Thymidylate-synthétase / Thymidylate synthase
UK	: Uridine kinase
US	: Ultrasons / Ultrasound
UV-VIS	: Ultraviolet-Visible
VEGF	: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire / Vascular endothelial growth factor
VP	: Gel de phospholipides vésiculaires / Vesicular phospholipid gel
ζ-potential	: Potentiel zêta / Zeta potential
5-FU	: 5-Fluorouracile / 5-Fluorouracil
5-FU-Cu-PEI	: Complexe 5-Fluorouracile-cuivre-polyéthylèneimine / 5-Fluorouracil- copper-polyethylenimine complex
5-FU-LNTS / 5-FU-NTSLs	: LNTS encapsulant le complexe 5-FU-Cu-PEI / NTSLs encapsulating 5-FU-Cu-PEI complex
5-FU-LTST / 5-FU-TSLs	: LTST encapsulant le complexe 5-FU-Cu-PEI / TTSLs encapsulating 5-FU-Cu-PEI complex

Liste des figures

Travaux antérieurs

- Figure 1.** Schéma plan de la bicouche lipidique de liposomes (gauche) et schéma d'une molécule de phospholipide (droite). 27
- Figure 2.** Exemple d'encapsulation de molécules hydrophiles (gauche), amphiphiles (milieu) ou hydrophobes (droite) dans un liposome (les molécules encapsulées sont représentées en rose). 28
- Figure 3.** Schéma général du mécanisme de préparation de liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique. 29
- Figure 4.** Libération intracellulaire passive de molécules actives encapsulées dans les liposomes par interaction liposome-cellule. 32
- Figure 5.** Différentes conformations du PEG à la surface des liposomes en fonction de leur concentration molaire. 36
- Figure 6.** Transition de phase gel-cristal liquide $L_{\beta'}$ - L_{α} des phospholipides au sein de la bicouche lipidique. Exemple de la DPPC. 50
- Figure 7.** Structure chimique de la DPPC. 51
- Figure 8.** Structure chimique du CHOL (gauche). Représentation schématisée de l'insertion du CHOL au niveau de la bicouche (droite). 52
- Figure 9** Structures chimiques de l'éthylène glycol (gauche) et du DSPE-PEG₂₀₀₀ (droite)... 54
- Figure 10.** Structure chimique du MSPC. 55
- Figure 11.** Schéma de la structure postulée des défauts membranaires qui se traduisent par des fuites à 37°C à travers une bicouche de DPPC ou de DPPC/MSPC en présence du DSPE-PEG en phase solide en l'absence de nanopores (haut), et de la perméabilité accrue d'une bicouche de DPPC/MSPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ dans la région de transition de phase à travers les pores de MSPC stabilisés par le DSPE-PEG₂₀₀₀ (bas). 57
- Figure 12.** Structures chimiques des pyrimidines. 66
- Figure 13.** Anabolisme, catabolisme et mécanisme d'action du 5-FU. 68
- Figure 14.** Structures chimiques de l'éthylèneimine (gauche) et de la PEI800 branchée (droite). 75
- Figure 15.** Schéma d'un LTST furtif chargé du complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI. 77

Chapitre 1

- Figure 1.** *In vitro* FUS setup (A) and dual-compartment setup (B) consisting in the sample holder placed into a glycerol-filled cuvette. 105
- Figure 2.** Liposomes size (nm) and polydispersity index (brackets) as a function of extrusion cycle number in presence of various CHOL mol% 107
- Figure 3.** DSC thermograms obtained from liposomes made of DPPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ upon heating at 5°C/min according to CHOL mol%. 108
- Figure 4.** T_{onset} and corresponding normalized enthalpy obtained from liposomes upon heating at 5°C/min according to CHOL mol%. 108
- Figure 5.** Release profile of encapsulated calcein from the different liposomal systems according to CHOL mol% and heating temperature for 5 min using a water-bath. 109

Figure 6. (A) Comparison of the temperature increment induced by FUS (1.75 MPa, 400 cycles, 1 kHz PRF) using glycerol-filled or water-filled cuvettes. Panels B and C show time-temperature curves as a function of the acoustic parameters using the glycerol-filled cuvette. Results are displayed as a function of the peak-negative pressure (400 cycles, 1 kHz PRF) in panel (B) and the number of cycles (1.75 MPa, 1 kHz PRF) in panel (C).....	110
Figure 7. Temperature dependence of calcein release from liposomes after 10 min water-bath (WB) heating (A). Results after FUS exposure are displayed as a function of acoustic pressure in panel B for 400 cycles, repetition of 1 kHz and 10 min insonation.....	112
Figure 8. Calcein release from liposomes as a function of the exposure duration for water-bath (WB) and FUS heating	112
Figure 9. Cryo-TEM images of TSLs after 10 minutes heating in a water bath at 37°C (A) and at 42°C (B). Images of TSLs after FUS exposure (400 cycles, 1 kHz PRF, exposure time 10 min) at 1 MPa and at 2 MPa are displayed in panels C and D, respectively.	113
Figure 10. Mean diameters of TSLs (A) and NTSLs (B) exposed to different water-bath and FUS heating during 10 min (n = 100 liposomes). Statistical analysis was performed using the nonparametric experiments Mann-Whitney test..	114
Figure S1. Calcein fluorescence intensity as a function of calcein concentration.	118

Chapitre 2

Figure 1. 5-FU encapsulation into liposomes containing 0, 5 or 30 mol% CHOL as a function of drug to lipid initial ratio (mM:mM). Panels represent 5-FU encapsulation efficacy for A) 5-FU:lipid 12 mM:12 mM, B) 5-FU:lipid 12 mM:40 mM, C) 5-FU:lipid 53.8 mM:40 mM and D) 5-FU:lipid 53.8 mM:80 mM. The corresponding 5-FU:lipid final ratios (mmol:mmol) are given between brackets above the histograms.	139
Figure 2. Absorbance spectra of Cu acetate (light blue) and of Cu-PEI complex in PBS (dark blue). The inset shows the influence of Cu concentration on the absorbance of the Cu-PEI complex at 285 nm. The initial PEI concentration was 1630 mM, and the final PEI concentration after dilution was 1 mM.	141
Figure 3. Preliminary results of the size of liposomes composed of 5 mol% CHOL encapsulating Cu-PEI complex at different polymer concentrations. Cu concentration was 600 mM.	141
Figure 4. 5-FU active entrapment kinetics as Cu-PEI-loaded liposomes containing 5 or 30 mol% CHOL were incubated at 30°C with 107.6 mM 5-FU (10 mM PBS + 1665 mM dextrose, pH 7.4). Inset: Equivalent 5-FU final encapsulated concentration..	143
Figure 5. Release profile in PBS of encapsulated 5-FU-Cu-PEI from 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes upon heating for 10 min in A) water bath at 37, 39, 42, 45 and 49°C after dilution by 10 mM PBS (1776 mM dextrose) B) FUS setup at 1, 1.25, 1.5 1.75 and 2 MPa and C) FUS setup at 1.75 MPa for 5, 10, 20 and 30 min. Temperature increment induced by FUS was measured at the focal distance using a thermocouple placed into the sample holder. Samples were compared to a control of each formulation kept at 4°C.....	145
Figure 6. HT-29 cell viability determined using the MTs assay after 48 h exposure to formulations and controls. Viability was plotted as a function of 5-FU concentration (A and B), lipid concentration (C and D) or Cu concentration (E and F).....	147
Figure S 1. 5-FU release in PBS from 5-FU-loaded liposomes upon heating for 10 min in A) water bath at 37, 39, 42, 45 and 49°C B) FUS at 0 (4°C), 1, 1.25, 1.5 1.75 and 2 MPa. Samples were compared to a control of each formulation kept at 4°C.....	153

Chapitre 3

Figure 1. Growth curve of subcutaneous HT-29 tumor cells in the right flank of female mice	167
---	-----

Figure 2. A) Plasma kinetics of 5-FU-TSLs, 5-FU-NTSLs and 5-FU solution. 5-FU was intravenously administered (22 mg 5-FU/kg body weight) into tumor-bearing mice. 5-FU plasma concentration (μM) is plotted. The blood clearance can be described with a biexponential time dependence. B) Fitting of 5-FU concentration in plasma over the distribution phase.....	171
---	-----

Figure 3. Biodistribution of 5-FU at 4 h and 24 h after intravenous administration of 5-FU (22 mg 5-FU/kg body weight) in different formulations into tumor-bearing mice. Data points and error bars are the average and standard deviation of the four mice.	174
---	-----

Travaux non soumis à publication

Figure 1. Efficacité d'encapsulation du 5-FU à l'intérieur des liposomes (0, 5 ou 30 mol% CHOL) en fonction de la technique d'encapsulation et de la concentration du 5-FU.	186
---	-----

Figure 1. Efflux d'eau à l'extérieur des liposomes précédant le rétrécissement du liposome en réponse au gradient osmotique.	189
--	-----

Figure 3. Stabilité des LTST et LNTS chargés du complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI au gradient osmotique, représentée par le pourcentage de fuite du $2\text{-}^{14}\text{C}$ -5-FU.....	192
--	-----

Discussion générale

Figure 1. Représentation graphique de la conformation moléculaire (haut) et du degré de protonation de la PEI en fonction du pH (bas).....	205
---	-----

Figure 2. Amélioration de la rétention du 5-FU à l'intérieur des LTST et des LNTS, sous l'effet d'une dilution au dixième, par encapsulation active sous forme de complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI.....	207
---	-----

Figure 3. Structure chimique du DPPGOG.....	209
--	-----

Figure 4. Technique hypothétique d'encapsulation du complexe 5-FU-Cu-PEI par gradient de sulfate.	211
---	-----

Figure 5. Coloration bleue de la queue et de la partie inférieure unilatérale du corps des souris suite à l'injection par voie IV des 5-FU-LTST et des 5-FU-LNTS.	215
---	-----

Annexe

Figure 1. Forme et morphologie des auto-assemblages des lipides en fonction de la valeur du paramètre d'empilement P.....	229
--	-----

Liste des tableaux

Travaux antérieurs

Tableau 1. Méthodes de préparation des liposomes PEGylés.....	35
Tableau 2. Profil et caractéristiques de molécules ou de vecteurs pour bénéficier de l'effet EPR.....	38
Tableau 3. Contraintes de l'effet EPR et solutions proposées..	41
Tableau 4. Tableau récapitulatif des températures de transition de phase principale des différents phospholipides synthétiques..	50
Tableau 5. Tableau récapitulatif comparatif des deux catégories de LTS.	59
Tableau 6. Tableau récapitulatif des différentes sources d'HT.....	63

Chapitre 2

Table 1. Liposome hydrodynamic diameters and PDI as a function of the initial 5-FU:lipid ratio. Liposomes were extruded 10 times and subsequently diluted in PBS prior to measurement.....	138
Table 2. Overview of liposome formulations. Samples were diluted either in 10 mM PBS or in 10 mM PBS + 1776 mM dextrose for size measurement and in deionized water for zeta potential measurement..	142
Table 3. 5-FU:lipid, 5-FU:Cu and Cu:lipid ratios of purified liposomes after 24 h of incubation with 5-FU.	144
Table 4. Inhibitory concentration (IC ₅₀) of the different formulations and controls in terms of 5-FU, Cu or lipid concentration on HT-29 cells after 48 hours exposure as revealed by the MTS assay. NC = does not contain CHOL..	148

Chapitre 3

Table 1. Physicochemical properties of 5-FU-TSLs and 5-FU-NTSLs. Samples were diluted in 10 mM PBS + 1776 mM dextrose prior to size measurement and in deionized water for zeta potential measurement.....	170
Table 2. Pharmacokinetics parameters for 5-FU when administered intravenously as solution, TSLs and NTSLs. All formulations were injected at 22 mg 5-FU/kg body weight into tumor-bearing mice.....	169

Travaux de recherche non soumis à publication

Tableau 1. Effet de la technique de C/D sur la taille des liposomes encapsulant le 5-FU.	186
Tableau 1. Osmolalité des solutions du complexe binaire et ternaire, d'égales concentrations, comparée au PBS iso-osmotique.	191

Discussion générale

Tableau 1. Récapitulatif des facteurs physiques, chimiques et biologiques influençant l'efficacité de libération sous HT induite par des FUS.	214
---	-----

Introduction générale

Introduction générale

Depuis qu'ils ont été décrits par Bangham *et al.* en 1965 (Bangham *et al.*, 1965a; Bangham *et al.*, 1965b), les liposomes ont constitué des vecteurs efficaces de principes actifs anticancéreux qui réduisent la toxicité systémique de la chimiothérapie (Batist *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2008; Jain and Stylianopoulos, 2010). Après de nombreuses années de recherche et de développement dans ce domaine, la FDA a approuvé la mise sur le marché de plusieurs nanomédicaments à base de liposomes en cancérologie (Jain and Stylianopoulos, 2010). En dépit de cet énorme progrès, les liposomes actuels ne sont pas suffisamment optimisés en termes de contrôle de la libération. De plus amples investigations sont donc nécessaires afin de concevoir des systèmes cliniquement performants pour la chimiothérapie anticancéreuse. La libération de principes actifs à partir des liposomes est essentiellement gouvernée par la diffusion de Fick, ce qui a pour effet de la rendre souvent incomplète et lente (Charrois and Allen, 2004), entravant ainsi un effet thérapeutique optimal (Kong *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013). Les liposomes thermosensibles ont été développés pour contourner cette limitation des liposomes conventionnels. Les liposomes thermosensibles se caractérisent par une libération spécifique et unique en réponse à une hyperthermie appliquée localement au niveau d'une tumeur. Deux catégories de liposomes thermosensibles sont rapportées dans la littérature : les liposomes thermosensibles dits traditionnels qui se caractérisent par une cinétique de libération intermédiaire du principe actif, sous application d'une hyperthermie locale comprise entre 42 et 45°C, et les liposomes thermosensibles contenant un lysolipide qui libèrent leur charge selon une cinétique ultrarapide, sous l'effet d'une hyperthermie locale comprise entre 41 et 42°C. Nous nous sommes intéressés aux liposomes thermosensibles traditionnels qui présentent une meilleure stabilité à 37°C tout en libérant le principe actif dans le microenvironnement tumoral. Ces systèmes devraient permettre d'apporter une dose suffisante de principe actif au contact des cellules tumorales sans toutefois exposer les tissus sains au principe actif cytotoxique (Banno *et al.*, 2010; Kheirrolomoom *et al.*, 2013; Needham *et al.*, 2013).

L'objectif du présent travail de thèse est de concevoir un nouveau modèle de liposomes thermosensibles traditionnels capables, en réponse à une hyperthermie locale modérée (39-42°C), de se déstabiliser et de libérer massivement le principe actif encapsulé favorisant ainsi une efficacité thérapeutique optimale au niveau de la tumeur et une toxicité systémique réduite. Le principe actif anticancéreux choisi pour ce projet de thèse est le 5-Fluorouracile afin de coupler la technologie innovante des liposomes thermosensibles à une molécule hydrosoluble

largement utilisée, bien caractérisée et approuvée dans la chimiothérapie des cancers. Pour atteindre cet objectif, deux techniques d'encapsulation du 5-Fluorouracile ont été mises en place afin de concevoir les liposomes thermosensibles les plus stables.

Ce manuscrit a été divisé en deux parties. Dans une première partie, une étude des travaux antérieurs décrit l'état de l'art dans le domaine des liposomes thermosensibles ainsi que les différentes techniques adoptées pour leur obtention. Cette étude montre que la majorité des liposomes thermosensibles traditionnels sont constitués d'un phospholipide thermotrope, la 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DPPC), dont la température de transition de phase est légèrement supérieure à la température physiologique (i.e. $41,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). La DPPC est souvent associée au cholestérol pour favoriser la stabilité du système vis-à-vis des composants du sang, et à un lipopolymère de polyéthylène glycol pour assurer la furtivité de la formulation. Cette revue de la littérature a permis de conclure que les liposomes thermosensibles traditionnels peuvent constituer des vecteurs intéressants en termes de stabilité à la température physiologique et de déstabilisation sous hyperthermie modérée.

Dans une deuxième partie, nous exposons les travaux expérimentaux qui seront développés sous forme de trois chapitres, chacun présenté sous forme de publication scientifique.

Ce travail de thèse a permis la conception, la caractérisation physicochimique ainsi que l'évaluation toxicologique *in vitro* et *in vivo* de nouveaux liposomes thermosensibles traditionnels encapsulant le 5-Fluorouracile. Dans ce contexte, deux types de liposomes de 5-Fluorouracile ont été évalués : les liposomes thermosensibles et leur contrôle non thermosensibles.

Le premier chapitre s'intéresse à la préparation ainsi qu'à l'optimisation du diamètre de différents types de liposomes, à l'évaluation de leur thermosensibilité en fonction de leur contenu en cholestérol. La capacité de ces liposomes à libérer une molécule modèle encapsulée dans leur cavité aqueuse sous l'effet d'une hyperthermie a ensuite été évaluée et a permis de comparer l'efficacité de l'hyperthermie engendrée par des ultrasons focalisés à celle obtenue dans un bain-marie thermostaté.

Le deuxième chapitre présente les résultats d'encapsulation du 5-Fluorouracile dans deux types de liposomes contenant deux pourcentages différents de cholestérol et qui représentent les liposomes thermosensibles traditionnels et leur contrôle non thermosensible. Egalement, dans ce chapitre, les techniques adoptées pour optimiser l'encapsulation du 5-Fluorouracile notamment par complexation avec le cuivre et la polyéthylèneimine sont décrites. La libération du 5-Fluorouracile *in vitro* induite par l'hyperthermie a été étudiée et a permis de comparer encore une fois l'efficacité de l'hyperthermie engendrée par des ultrasons focalisés à celle

obtenue dans un bain-marie thermostaté. Finalement les résultats de cytotoxicité *in vitro* du 5-Fluorouracile complexé ou non sont exposés.

Le troisième chapitre de cette thèse rapporte les résultats de pharmacocinétique et de distribution tissulaire obtenus *in vivo* chez la souris nude porteuse d'un modèle de tumeur colorectale xénogreffée HT-29.

Ces travaux expérimentaux ont permis d'étudier l'influence du cholestérol inséré au niveau de la bicouche des liposomes sur leur thermosensibilité et leur propriété de libération. Egalement, ces travaux ont permis d'évaluer l'intérêt de la complexation du 5-Fluorouracile avec le cuivre et la polyéthylèneimine afin d'obtenir une stabilité d'encapsulation. Les études de toxicité ont mis en évidence l'absence de toxicité additive ou de réduction de l'effet cytotoxique du 5-Fluorouracile complexé au cuivre et à la polyéthylèneimine.

Enfin, l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse a fait l'objet d'une discussion générale avant de terminer par la conclusion générale de ce travail et les perspectives.

Références

- Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C. (1965a). "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids." Journal of Molecular Biology **13**(1): 238-252.
- Bangham, A. D., Standish, M. M. and Weissmann, G. (1965b). "The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations." Journal of Molecular Biology **13**(1): 253-259.
- Banno, B., Ickenstein, L. M., Chiu, G. N. C., Bally, M. B., Thewalt, J., Brief, E. and Wasan, E. K. (2010). "The Functional Roles of Poly(Ethylene Glycol)-Lipid and Lysolipid in the Drug Retention and Release from Lysolipid-Containing Thermosensitive Liposomes In Vitro and In Vivo." Journal of Pharmaceutical Sciences **99**(5): 2295-2308.
- Batist, G., Ramakrishnan, G., Rao, C. S., Chandrasekharan, A., Gutheil, J., Guthrie, T., Shah, P., Khojasteh, A., Nair, M. K., Hoelzer, K., Tkaczuk, K., Park, Y. C., Lee, L. W. and Myocet Study, G. (2001). "Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer." Journal of Clinical Oncology **19**(5): 1444-1454.
- Charrois, G. J. R. and Allen, T. M. (2004). "Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1663**(1-2): 167-177.
- Davis, M. E., Chen, Z. and Shin, D. M. (2008). "Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer." Nature Reviews Drug Discovery **7**(9): 771-782.
- Jain, R. K. and Stylianopoulos, T. (2010). "Delivering nanomedicine to solid tumors." Nature Reviews Clinical Oncology **7**(11): 653-664.
- Kheirrolomoom, A., Lai, C.-Y., Tam, S. M., Mahakian, L. M., Ingham, E. S., Watson, K. D. and Ferrara, K. W. (2013). "Complete regression of local cancer using temperature-sensitive liposomes combined with ultrasound-mediated hyperthermia." Journal of Controlled Release **172**(1): 266-273.
- Kong, G., Anyambhatla, G., Petros, W. P., Braun, R. D., Colvin, O. M., Needham, D. and Dewhirst, M. W. (2000). "Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: Importance of triggered drug release." Cancer Research **60**(24): 6950-6957.
- Li, L., ten Hagen, T. L. M., Hossann, M., Süß, R., van Rhooon, G. C., Eggermont, A. M. M., Haemmerich, D. and Koning, G. A. (2013). "Mild hyperthermia triggered doxorubicin release from optimized stealth thermosensitive liposomes improves intratumoral drug delivery and efficacy." Journal of Controlled Release **168**(2): 142-150.
- Li, L., ten Hagen, T. L. M., Schipper, D., Wijnberg, T. M., van Rhooon, G. C., Eggermont, A. M. M., Lindner, L. H. and Koning, G. A. (2010). "Triggered content release from optimized stealth thermosensitive liposomes using mild hyperthermia." Journal of Controlled Release **143**(2): 274-279.

Needham, D., Park, J. Y., Wright, A. M. and Tong, J. H. (2013). "Materials characterization of the low temperature sensitive liposome (LTSL): effects of the lipid composition (lysolipid and DSPE-PEG2000) on the thermal transition and release of doxorubicin." Faraday Discussions **161**: 515-534.

Travaux antérieurs

Travaux antérieurs

1. Généralités sur les liposomes

1.1. Liposomes : de la molécule amphiphile à la vésicule

Les liposomes sont essentiellement composés de phospholipides, plus rarement de sphingolipides ou encore de molécules amphiphiles synthétiques. Les phospholipides sont des molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire hydrophile et d'une paire de chaînes aliphatiques hydrocarbonées (acyles) hydrophobes (Figure 1). Etant insolubles dans l'eau, le caractère amphiphile des phospholipides détermine leur comportement en solution aqueuse. Ainsi, ces molécules tendent à s'auto-assembler afin de protéger leurs chaînes hydrophobes de l'eau. L'auto-assemblage des phospholipides en solution aqueuse est dicté par le paramètre d'empilement P (packing parameter) qui les caractérise (Israelachvili and Mitchell, 1975). $P = v/(a_0.l_c)$ où v est le volume occupé par les chaînes hydrophobes, a_0 la surface de la tête polaire à l'équilibre et l_c la longueur des chaînes hydrophobes. Ce paramètre permet de caractériser la forme prise par la molécule (cylindre, cône etc...) et donc la morphologie des auto-assemblages (bicouches, micelles, micelles inverses etc...) (Annexe 1). Ainsi, les phospholipides possédant une forme moléculaire cylindrique, comme la phosphatidylcholine, la phosphatidylsérine, et le phosphatidylinositol, possèdent un P compris entre 0,5 et 1 leur permettant par la suite de s'auto-assembler en bicouches lipidiques. Par conséquent, au contact d'une solution aqueuse, ces phospholipides tendent à s'aligner étroitement en bicouches planes afin de minimiser les interactions défavorables entre leurs chaînes hydrocarbonées et le milieu aqueux. En outre, ces bicouches se referment sur elles-mêmes pour former des vésicules closes et scellées ce qui élimine complètement les interactions défavorables avec le milieu aqueux tout en enfermant un certain volume aqueux. Les liposomes se forment donc en conséquence de l'organisation supramoléculaire la plus stable de ces lipides en bicouches.

Les liposomes sont donc par définition des structures vésiculaires constituées de bicouches de molécules lipidiques amphiphiles qui délimitent deux compartiments aqueux : un compartiment aqueux interne et un compartiment aqueux externe dans lequel les vésicules se trouvent en suspension (Benoît *et al.*, 2007). L'épaisseur de la bicouche lipidique dépend des propriétés géométriques des lipides qui la constituent, ainsi que de l'état physique de la bicouche. Ainsi, une bicouche formée purement de 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DPPC) à l'état gel possède une épaisseur de 63,3 Å (Carion-Taravella *et al.*, 2002). Le diamètre des liposomes varie d'une dizaine de nanomètres à quelques micromètres.

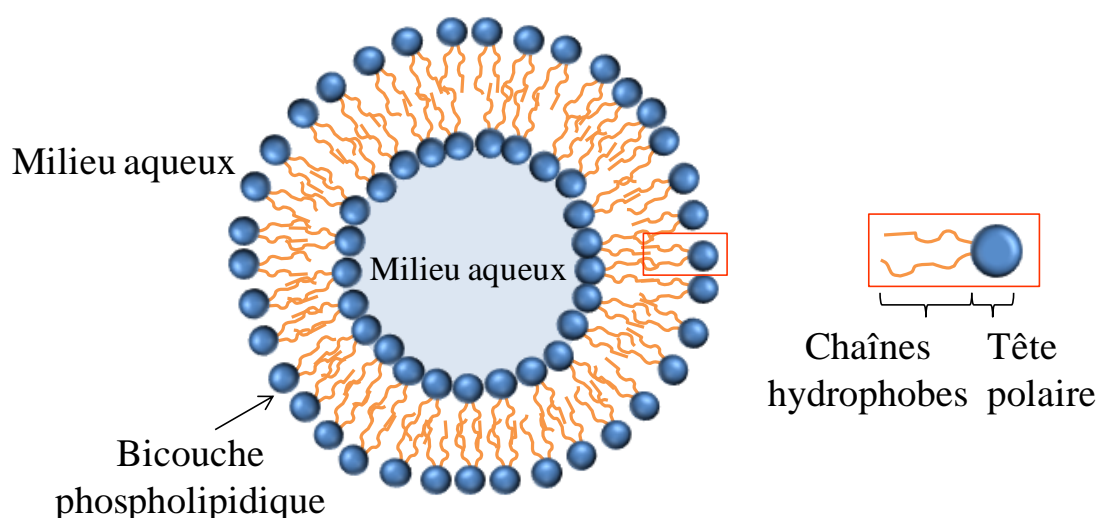


Figure 1. Schéma plan de la bicouche lipidique de liposomes (gauche) et schéma d'une molécule de phospholipide (droite).

1.2. Liposomes comme vecteur de molécules actives

Les liposomes ont été découverts au début des années 60 par Alec Bangham (Bangham *et al.*, 1965a; Bangham *et al.*, 1965b). Principalement utilisés comme modèle membranaire pour l'étude de la structure et des propriétés des membranes biologiques (Bangham *et al.*, 1965a), les liposomes suscitent rapidement un grand intérêt en tant que nanovecteurs de choix pour des applications pharmaceutiques (Gregoriadis, 1988; Wang *et al.*, 2012) et cosmétiques (Lasic, 1998; Redziniak, 2003). De par leur nature non-toxique, biodégradable et biocompatible et du fait de leur structure vésiculaire, les liposomes constituent des vecteurs uniques pour la délivrance de différents principes actifs (PA). Les liposomes se prêtent à l'encapsulation des molécules hydrophiles dans leur espace interne aqueux (Figure 2), tandis que les molécules lipophiles peuvent être encapsulées dans la bicouche. Les molécules amphiphiles, quant à elles, s'insèrent à l'interface entre la cavité aqueuse et la bicouche (Desmettre *et al.*, 1996). Par conséquent, l'efficacité d'encapsulation des molécules hydrophiles dépend du volume de la cavité aqueuse alors que le volume de la bicouche lipidique affecte l'encapsulation des molécules lipophiles (Tan and Nakajima, 2005). A température physiologique (37°C), tout comme les membranes biologiques, la bicouche lipidique est relativement imperméable aux ions ainsi qu'aux grosses molécules polaires. Elle est partiellement perméable à l'eau, qui peut s'introduire entre les lipides sous l'effet de la pression osmotique, ainsi qu'aux molécules hydrophobes. Cette propriété assure la stabilité des liposomes tout au long de leur conservation ainsi que lors de leur circulation dans le sang (Drummond *et al.*, 1999).

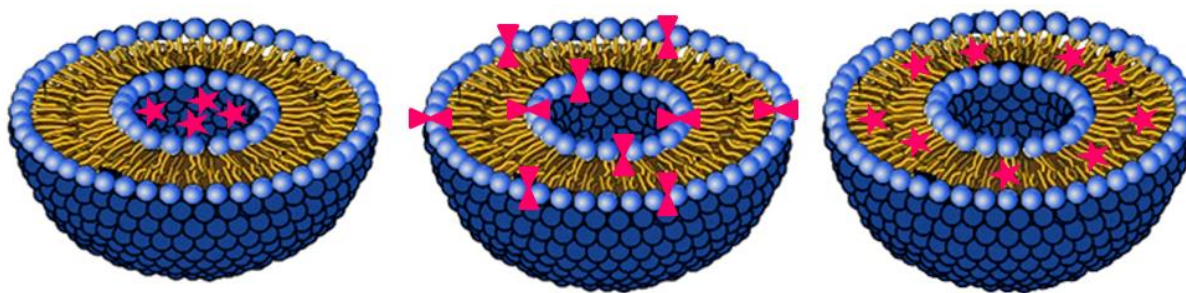


Figure 2. Exemple d'encapsulation de molécules hydrophiles (gauche), amphiphiles (milieu) ou hydrophobes (droite) dans un liposome (les molécules encapsulées sont représentées en rose).

1.3. Principe de la préparation des liposomes

Plusieurs méthodes de préparation des liposomes ont été développées et détaillées dans la littérature (Rickwood and Hames, 1989; Delattre *et al.*, 1993). La méthode la plus courante est celle dite d'hydratation du film lipidique. On commence par préparer un empilement de bicouches lipidiques obtenu en évaporant le solvant organique dans lequel les lipides sont préalablement dissous (Figure 3) (Kirby and Gregoriadis, 1984). Ces bicouches sont ensuite hydratées, dans des conditions de température adéquates et souvent sous agitation. Les liposomes ne se forment qu'à une température supérieure à celle de la transition de phase gel-liquide des lipides qui les composent. Cette étape permet aux bicouches de gonfler en présence d'une solution aqueuse puis de se refermer sur elles-mêmes en emprisonnant cette solution aqueuse, donnant naissance à des vésicules multilamellaires. La solution aqueuse utilisée est en général une solution tamponnée à pH 7,4 isotonique au plasma. Cependant, en vue d'améliorer la rétention de certaines molécules telles que la doxorubicine, des techniques d'encapsulation par gradient de pH (Mayer *et al.*, 1990) ou d'encapsulation à des concentrations intraliposomales au-dessus de leurs limites de solubilité ont été développées (Lasic *et al.*, 1992; Johnston *et al.*, 2008). Des traitements par des méthodes apportant de l'énergie mécanique telle que la sonication (Woodbury *et al.*, 2006), l'extrusion (Berger *et al.*, 2001), l'hydratation/déshydratation (Karlsson *et al.*, 2000) ou l'électroformation (Kuribayashi *et al.*, 2006) permettent enfin d'obtenir différentes classes de liposomes de diamètre et de morphologie différentes.

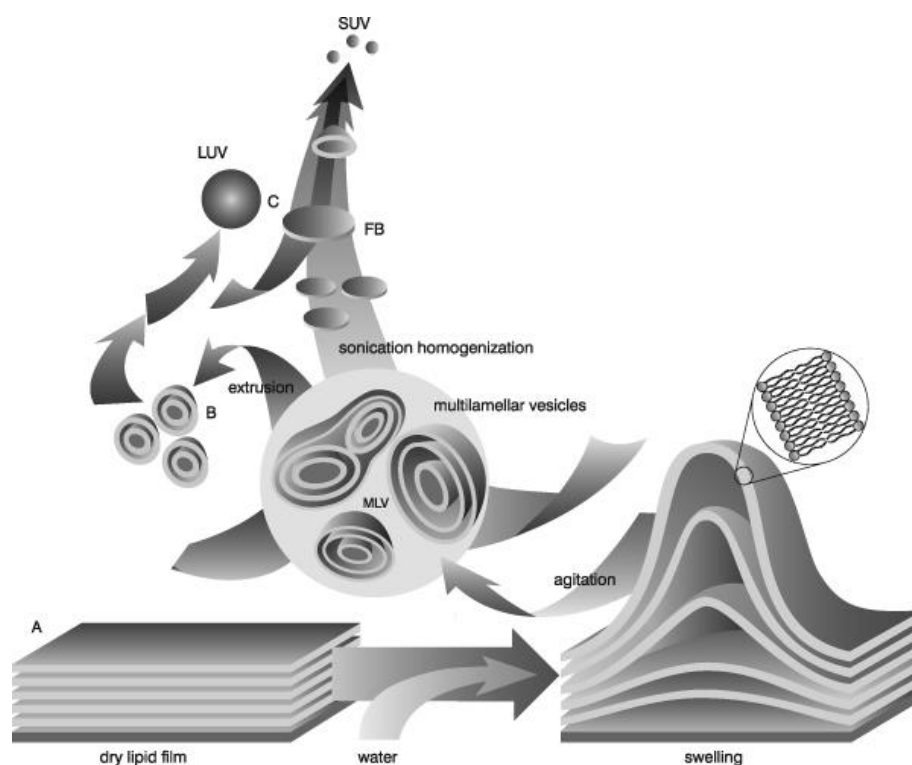


Figure 3. Schéma général du mécanisme de préparation de liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique. Adaptée de Avanti Polar Lipids.

1.4. Différentes classes de liposomes

En fonction de la méthode de préparation, les liposomes formés peuvent être très différents. Ils sont classés en fonction de leur diamètre et de leur nombre de bicouches lipidiques concentriques appelé lamellarité. On distingue les structures vésiculaires suivantes (Benoît *et al.*, 2007) (Figure 3) :

- Les vésicules unilamellaires (unilamellar vesicles) : constituées d'une seule bicouche concentrique. En fonction du diamètre des liposomes on distingue :
 - les vésicules unilamellaires de petite taille (small unilamellar vesicles ou SUV) de diamètre compris entre 20 et 80 nm.
 - les vésicules unilamellaires de grande taille (large unilamellar vesicles ou LUV) de diamètre compris entre 80 et 1000 nm.
- Les vésicules multilamellaires (multilamellar vesicles ou MLV) : constituées de plusieurs bicouches concentriques avec un diamètre compris entre 100 nm et quelques μm . Lorsque les MLV ne comptent que deux à trois bicouches elles sont appelées vésicules oligolamellaires (oligolamellar vesicles ou OLV).
- Les vésicules multivésiculaires (multivesicular vesicles ou MVV) : constituées de plusieurs vésicules emprisonnées dans une vésicule plus grosse.

2. Liposomes de 1^{ère} génération

2.1. Définition

Les liposomes de 1^{ère} génération appelés également « classiques » ou « conventionnels » désignent des vésicules composées d'une variété de phospholipides, glycolipides, ainsi que d'autres lipides synthétiques et dont le devenir est guidé par leur interaction avec le système immunitaire. Parmi les problèmes rencontrés par le développement des liposomes, ceux relatifs à la stabilité ont été les plus critiques.

2.2. Stabilité

Au cours des premiers travaux sur les liposomes conventionnels, il s'est avéré difficile de retenir les molécules encapsulées à l'intérieur des liposomes après administration par voie intraveineuse (IV) (Juliano and Stamp, 1978). Leur libération survenait notamment suite à l'exposition aux protéines sériques (Allen and Cleland, 1980; Senior and Gregoriadis, 1982) et particulièrement aux lipoprotéines telles que les lipoprotéines de haute densité (HDL). Ces problèmes de stabilité ont amené à modifier la composition de la bicouche en particulier par l'incorporation de cholestérol (CHOL) (Cullis, 1976; Allen and Cleland, 1980). L'insertion du CHOL entre les chaînes acyles des phosphatidylcholines saturées améliore l'hydratation des têtes polaires et augmente l'empilement et l'ordre au sein de la bicouche, ce qui favorise sa stabilité *in vitro* et réduit sa perméabilité aux ions et solutés améliorant ainsi la rétention des PA hydrophiles encapsulés ainsi que la résistance des liposomes à la déstabilisation par les composants sanguins notamment par les lipoprotéines (Gaber *et al.*, 1995; Semple *et al.*, 1996). Néanmoins, cet effet du CHOL est régi par sa concentration au niveau de la bicouche lipidique. A des concentrations supérieures à 30 mol%, la bicouche se retrouve dans un état plus perméable dit « cristal liquide » (liquide ordonné LO). De plus, au-delà d'un rapport équimolaire CHOL/lipide, le CHOL peut rompre la régularité de la structure linéaire de la bicouche lipidique entraînant par la suite une diminution de la stabilité des liposomes et de leur capacité d'encapsulation (Rickwood and Hames, 1989; El-Samaligy *et al.*, 2006). En général, les formulations comportent entre 5 et 45 mol% de CHOL ce qui constitue un bon compromis entre la stabilité des liposomes et l'auto-assemblage des lipides.

2.3. Cinétique de libération des molécules actives

La libération du PA encapsulé dans les liposomes intervient selon différents mécanismes : simple diffusion à travers la bicouche lipidique selon la loi de Fick et qui peut survenir à tous les niveaux après administration des liposomes *in vivo*, libération suite à l'interaction du liposome avec les cellules ou libération par déstabilisation du liposome modulée par des

facteurs internes ou externes comme une sensibilité au pH de l'environnement, à la présence d'enzymes, à la température, à l'application d'un champ magnétique, etc. Dans les deux premiers cas on parle d'une libération passive alors que dans le troisième cas on parle d'une libération active. La libération passive de molécules actives par interaction liposomes-cellules peut avoir lieu selon plusieurs mécanismes (Figure 4). Les liposomes chargés de PA peuvent (a) fusionner avec la membrane cellulaire et libérer leur contenu dans le cytoplasme de la cellule, ou (b) peuvent être destabilisés par certains composants de la membrane cellulaire lorsqu'ils sont adsorbés à la surface de sorte que le PA libéré peut entrer dans la cellule par l'intermédiaire de micropinocytose. Par ailleurs, le liposome peut être (c) internalisé par endocytose spécifique ou (d) non spécifique via un endosome qui fusionne ensuite avec un lysosome à pH acide et contient une forte concentration d'enzymes. Les enzymes lysosomales ainsi que le pH acide provoquent la dégradation du liposome favorisant ainsi la libération cytosolique du PA. Egalement, pendant que l'endosome est en route vers le lysosome, et dès les premières étapes d'acidification (pH voisin de 5,5), le liposome peut provoquer (e) une destabilisation de l'endosome, ce qui conduit à la libération du PA dans le cytoplasme de la cellule. Ce moyen est indispensable lorsque le PA vectorisé est fragile et risque d'être dégradé par les conditions extrêmes de pH afin de permettre au PA intact d'atteindre la cible intracellulaire. C'est le cas des liposomes pH-sensibles qui sont stables à pH 7,4 dans la circulation sanguine, mais se destabilisent dès que le pH atteint une valeur seuil de 5,5 en raison de la modification de l'ionisation d'un constituant de base (ex : acide oléique dans des liposomes de dioléoylphosphatidyléthanolamine) ou de la rupture d'une liaison acido-labile (cas des polymères couplés à un fragment hydrophobe en surface de liposomes). Une autre stratégie ayant pour objet la destabilisation de l'endosome consiste à recourir à un polymère particulier, la polyéthylèneimine (PEI), que l'on qualifie d'éponge à protons : son ionisation progressive au fur et à mesure de l'acidification de l'endosome provoque *in fine* la rupture de ce dernier, par un effet osmotique. Finalement, il est important de garder à l'esprit que le PA encapsulé dans les liposomes n'est pas biodisponible, et qu'il ne le devient qu'à la libération. D'où l'intérêt d'optimiser le taux et la vitesse de libération des PA à partir des liposomes afin d'assurer une biodisponibilité tissulaire élevée du PA intact et par la suite un effet thérapeutique significatif (Laginha *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'effet thérapeutique des anticancéreux spécifiques du cycle cellulaire tels que la vincristine peut être très sensible aux taux de libération (Boman *et al.*, 1994). La modulation du ratio PA/lipide constitue une méthode efficace pour obtenir des liposomes ayant un pourcentage de libération en accord avec les exigences de l'application thérapeutique (Johnston *et al.*, 2006).

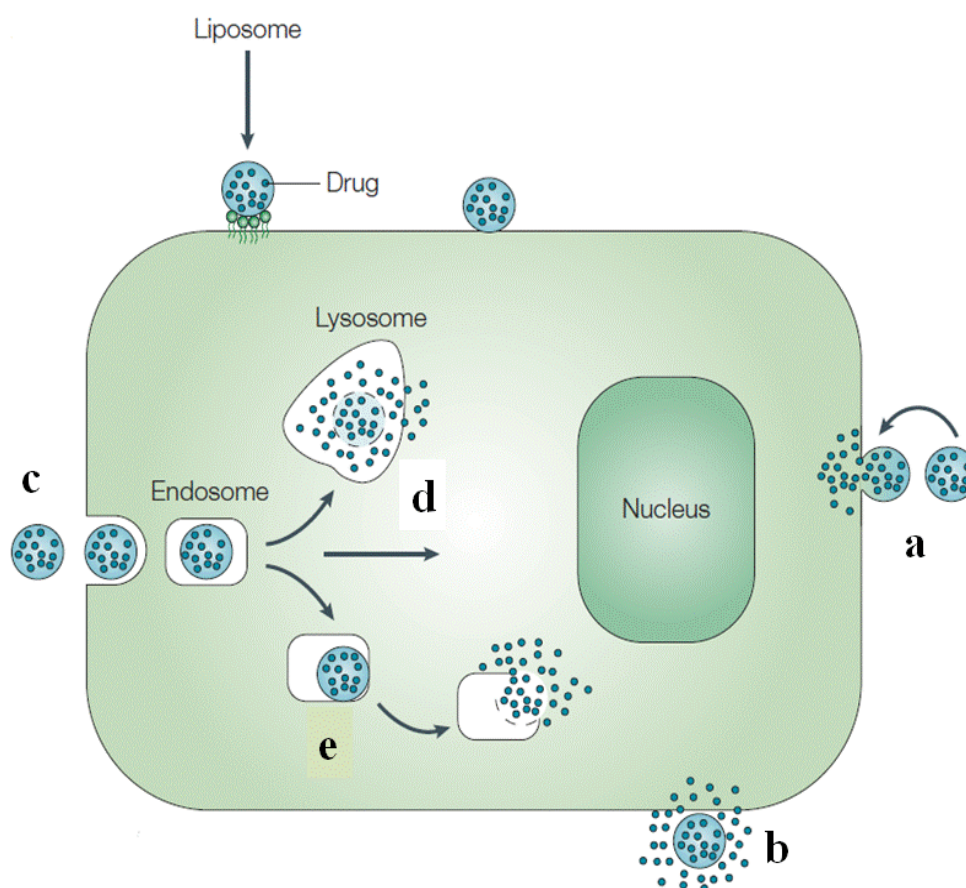


Figure 4. Libération intracellulaire passive de molécules actives encapsulées dans les liposomes par interaction liposome-cellule. Adaptée de Torchilin 2005 (Torchilin, 2005).

2.4. Devenir des liposomes de 1^{ère} génération après administration intraveineuse

Les liposomes «conventionnels» subissent une élimination rapide de la circulation avant d'atteindre le tissu pathologique suite à des interactions physiques avec des protéines spécifiques circulant dans le sang. Ce phénomène est communément appelé opsonisation. Les liposomes opsonisés sont par la suite facilement présentés au système immunitaire plus particulièrement au système des phagocytes mononucléés (SPM) localisé au niveau du foie (cellules de Küppfer), de la rate, des alvéoles pulmonaires, et de la moelle osseuse qui se charge de leur élimination par phagocytose (Gregoria and Neerunju, 1974). Cet effet réduit sensiblement leur distribution vers d'autres tissus de l'organisme. Les opsonines comprennent les protéines du complément (C3, C5, etc), la laminine, la fibronectine, la protéine C réactive, le collagène de type I et les immunoglobulines. Le déclencheur de l'activation des protéines du complément après l'administration de liposomes n'est pas complètement élucidé, mais le processus se termine par une cascade de réactions inflammatoires et complexes qui se

manifestent comme des symptômes de détresse cardio-pulmonaire transitoire (Markiewski *et al.*, 2007). Cette réaction immunitaire innée limite la capacité des liposomes à circuler longtemps dans le sang et à parvenir aux tissus pathologiques cibles. Plusieurs tentatives comme la saturation du SPM avec des doses élevées de liposomes non chargés en PA préalablement à l'administration des liposomes chargés en PA (Proffitt *et al.*, 1983) et la réduction de la taille des liposomes (Hwang *et al.*, 1987) n'ont eu pour effet qu'une amélioration modeste du temps de circulation des liposomes.

3. Liposomes de 2^{ème} génération

3.1. Définition

Après injection par voie IV, les liposomes de 2^{ème} génération, appelés également PEGylés ou Stealth[®] peuvent circuler dans le sang pendant de longues périodes de temps, en raison d'une moindre capture par les cellules macrophages du foie et de la rate. Le terme « Stealth[®] » a été enregistré en tant que marque déposée par Liposomes Technology, Inc. (Papahadjopoulos and Gabizon, 1995). On peut aussi utiliser le terme « liposomes stabilisés stériquement » qui désigne tout liposome ayant un temps de circulation long dans le sang indépendamment de la fluidité de la bicouche et de la densité de charge de surface grâce à la présence d'un revêtement polymère hydrophile à sa surface (Papahadjopoulos *et al.*, 1991; Papahadjopoulos and Gabizon, 1995). Ces liposomes ont été conçus sur la base de la structure des globules rouges dont le feuillet externe de la membrane plasmique contient des gangliosides qui sont des glycosphingolipides contenant de l'acide sialique. Effectivement, l'inclusion du GM1 (glycosphingolipide contenant un chaînon oligosaccharidique de 4 sucres et un acide sialique) a permis d'augmenter la demi-vie de circulation des liposomes. Par ailleurs, du fait de leur circulation prolongée, leur accumulation dans la tumeur a été observée car les liposomes sont capables de diffuser à travers les endothéliums fenêtrés grâce à l'effet EPR (enhanced permeation and retention) qui sera décrit plus loin (Allen and Chonn, 1987; Gabizon *et al.*, 1990). En dépit de ce succès, à l'utilisation de gangliosides naturels s'est substituée celle de lipopolymères de synthèse à base de polyéthylène glycol (PEG) relativement meilleur marché et plus flexible. Les lipopolymères à base de PEG sont caractérisés par une chaîne de longueur variable de PEG fixée au groupement acyle (lipides) par l'intermédiaire d'un groupement tel qu'un ester de phosphate, un ester de carboxylate, une liaison amide, disulfure ou une liaison éther (Zalipsky, 1995). Le plus utilisé d'entre eux est le 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-

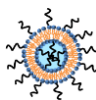
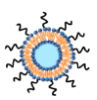
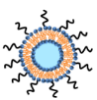
phosphoéthanolamine-PEG (DSPE-PEG). Ces molécules bénéficient d'un certain nombre de caractéristiques avantageuses (Allen and Hansen, 1991; Papahadjopoulos *et al.*, 1991) qui sont :

- Absence d'ionisation (pas d'interactions électrostatiques avec la bicouche lipidique si celle-ci est chargée).
- Forte solubilité dans les milieux aqueux et organiques. La solubilité du PEG dans les milieux organiques permet non seulement la synthèse des phospholipides PEGylés, mais facilite également la formulation de liposomes furtifs.
- Excellente biocompatibilité, absence de toxicité, faible immunogénicité et antigénicité (Immordino *et al.*, 2006).
- Bonne cinétique d'excrétion.
- Possibilité de synthèse de masses molaires (MM) variables (400 Da à 50 kDa) avec un faible indice de polydispersité (au-dessous de 1,1) et la possibilité d'associer des fonctions chimiques différentes à leur extrémité (Zalipsky, 1995).

3.2. Méthode d'insertion des lipopolymères à base de PEG

Les méthodes d'obtention de liposomes Stealth[®] sont au nombre de trois et peuvent aboutir à la formation de deux types différents de liposomes : un type incorporant des chaînes de PEG de part et d'autre de la bicouche et un type décoré uniquement à la surface avec des chaînes de PEG. Ces méthodes sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 1) :

Tableau 1. Méthodes de préparation des liposomes PEGylés.

Méthode de préparation	Avantages	Description brève	Limites	Procédé de purification	Schéma
Pré-insertion	Facile	-Incorporation des lipides-PEG au film lipidique avant hydratation	-Excès de lipide-PEG : coût additionnel -Viscosité élevée et extrusion difficile (Nakamura <i>et al.</i> , 2012) -Occupation de la cavité aqueuse par les chaînes de PEG: réduction de l'encapsulation du PA (Szeleifer <i>et al.</i> , 1998; Awasthi <i>et al.</i> , 2004) -Hydrolyse du lipide-PEG du au pH intraliposomal acide (encapsulation par gradient de pH) : modification pH interne, compromis encapsulation et rétention du PA (Nakamura <i>et al.</i> , 2012)	-Centrifugation (Shimada <i>et al.</i> , 2000) -Dialyse -Chromatographie sur colonne par exclusion de taille	
Post-insertion	-Processus spontané -Incorporation du PEG uniquement au niveau de la couche externe (Uster <i>et al.</i> , 1996) -Bon rendement d'incorporation (Shimada <i>et al.</i> , 2000; Nakamura <i>et al.</i> , 2012) -Propriétés de surface moins hétérogènes que les liposomes obtenus par pré-insertion (Nakamura <i>et al.</i> , 2012) -A une densité de PEG égale, capacité de circulation prolongée \geq a celle des liposomes obtenus par pré-insertion (Nakamura <i>et al.</i> , 2012)	-Addition d'une solution micellaire concentrée de lipides-PEG aux liposomes préformés (Uster <i>et al.</i> , 1996; Nakamura <i>et al.</i> , 2012)	-Incorporation dépendante du lipide-PEG (longueur PEG, longueur chaîne acyle) (Shimada <i>et al.</i> , 2000) -Perturbation de l'intégrité de la bicouche (incorporation asymétrique) (Shimada <i>et al.</i> , 2000) -Processus température-dépendant (Banno <i>et al.</i> , 2010) -Premier choix pour liposomes Stealth® fonctionnalisés avec anticorps ou peptides pour le ciblage actif	-Centrifugation {Shimada, 2000 #317 -Dialyse -Chromatographie sur colonne par exclusion de taille {Banno, 2010 #262}	
Post-modification par réaction chimique	-Incorporation du PEG uniquement au niveau de la couche externe -Réaction chimiosélective et bioorthogonale	-Fonctionnalisation de la surface des liposomes préformés par couplage des chaînes de PEG aux têtes polaires (chimie « click » (Cavalli <i>et al.</i> , 2006; Kumar <i>et al.</i> , 2010), formation d'oxime (Feldborg <i>et al.</i> , 2012), conjugaison photoactivée (Fendler, 1984))	-Fragilité du fait des conditions de couplage (solvants) -Difficulté du couplage en milieu aqueux -Agrégation et ségrégation	-EDTA + Chromatographie sur colonne par exclusion de taille (Cavalli <i>et al.</i> , 2006; Kumar <i>et al.</i> , 2010)	

La conformation réelle du PEG à la surface des liposomes dépend du pourcentage molaire de lipides PEGylés (ou du taux de greffage pour la post-modification) et de la MM du PEG (Figure 5) (Degennes, 1980; Immordino *et al.*, 2006). Pour le DSPE-PEG₂₀₀₀, à une densité < 5 mol%, le greffage des chaînes est en régime champignon, à une densité > 5 mol% le greffage en régime brosse domine alors qu'à une densité > 15 mol% le greffage est en régime brosse avec une formation favorisée de micelles en équilibre avec les lipides PEGylés insérés dans la bicouche (Allen *et al.*, 2002) (Figure 5).

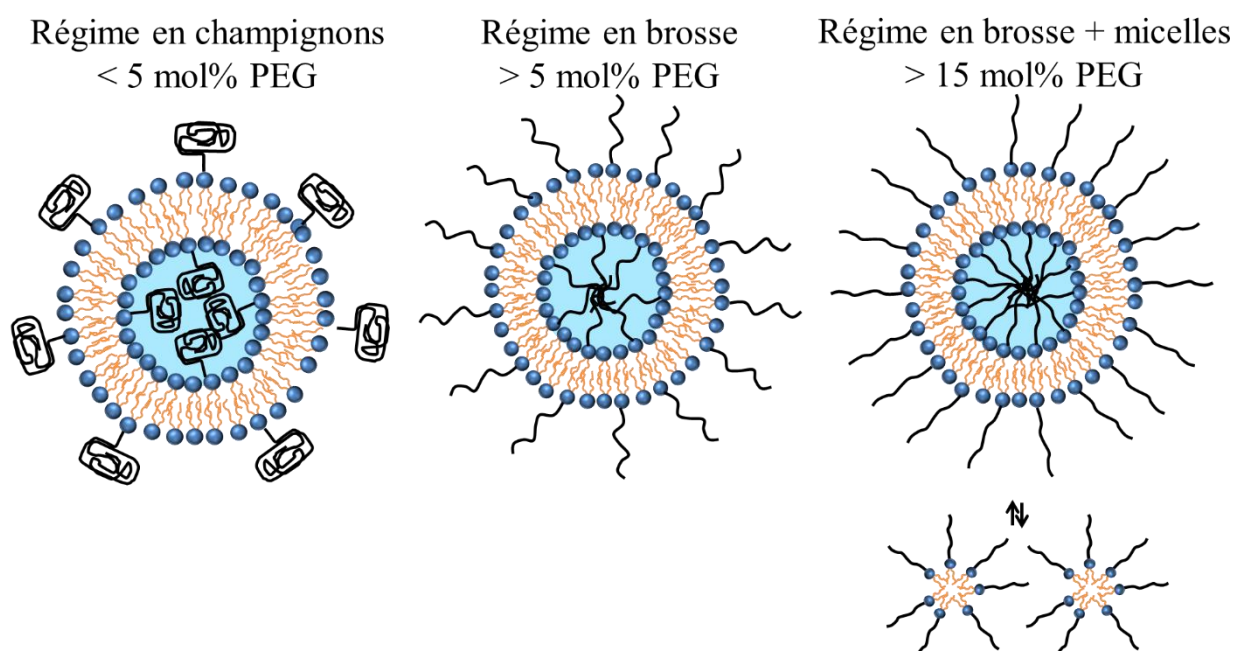


Figure 5. Différentes conformations du PEG à la surface des liposomes en fonction de leur concentration molaire.

3.3. Mécanisme d'action et propriétés pharmacocinétiques

Le mécanisme par lequel la stabilisation stérique des liposomes augmente leur demi-vie dans la circulation a été largement discuté (Lasic *et al.*, 1991). Le concept de base s'explique par la présence des chaînes flexibles de polymère hydrophile qui occupent l'espace immédiatement adjacent à la surface du liposome (couche périliposomale), en conformation champignon ou brosse, et qui tend à exclure d'autres macromolécules de cet espace. Par conséquent, l'accès et la liaison d'opsonines du plasma sanguin à la surface des liposomes sont entravés par répulsions stériques, et ainsi les interactions des macrophages du SPM avec les liposomes non opsonisés sont réduites (Allen, 1994). La stabilisation stérique se réfère à la stabilité colloïdale (Lasic and Needham, 1995) conférée par ces polymères aux liposomes circulants. Toutefois, la stabilisation stérique conférée par les lipides PEGylés est d'une durée finie. Allen et ses collaborateurs ont suggéré que l'élimination des liposomes stabilisés stériquement peut se

produire par le même mécanisme que les liposomes conventionnels, c'est à dire par le SPM, après une désorption graduelle du DSPE-PEG à partir de la bicouche (Allen *et al.*, 1991; Allen, 1994). Blume et Cevc (Blume and Cevc, 1993) ont suggéré que les liposomes stabilisés stériquement peuvent simplement exiger plus de temps pour lier les opsonines nécessaires à leur capture par le SPM. Récemment, les travaux de Nag *et al.* ont montré que les molécules phospholipides-PEG se désorbent progressivement à partir de la surface du liposome, et que cette désorption est un phénomène temps- et dilution-dépendante et peut évidemment se produire *in vivo* où le taux de désorption pourrait être plus élevé du fait de la très forte dilution et de la présence du plasma (Nag *et al.*, 2013). Il en résulte toutefois une amélioration de leur temps de circulation et ainsi une durée de vie prolongée (Papahadjopoulos *et al.*, 1991).

L'influence du PEG sur la circulation des liposomes dans le sang dépend à la fois de la longueur de chaîne de PEG et de leur concentration molaire par rapport à la concentration en lipides. En général, les chaînes de PEG longues offrent une meilleure barrière stérique que de courtes chaînes de PEG. Par exemple, les niveaux de liposomes sanguins ont augmenté de 16% à 28 % lorsque la MM de PEG passe de 750 à 5000 Da (Allen *et al.*, 1991). Par ailleurs, le DSPE-PEG comportant deux chaînes de PEG de longueurs différentes de 2000 et de 500 Da sur la même molécule, permet d'obtenir un temps de circulation plus long ainsi qu'une internalisation cellulaire des liposomes supérieure à celle des liposomes PEGylés avec du PEG à chaîne unique (Sugiyama and Sadzuka, 2013). La stabilisation stérique des liposomes est également influencée par la taille des liposomes. Il existe une taille maximale de liposome (~ 275 nm) au-delà de laquelle la propriété de furtivité est compromise (Awasthi *et al.*, 2003). La perméabilité des liposomes, la cinétique et le mécanisme de libération du PA sont enfin influencés par la présence du phospholipide-PEG. L'augmentation ou la diminution de la libération du PA est fonction des propriétés physicochimiques de la molécule. Par exemple, la perméabilité des liposomes de DSPC/CHOL et EPC/CHOL en fonction de la quantité incorporée de DSPE-PEG₂₀₀₀ a montré qu'à un maximum de 8 mol% en DSPE-PEG₂₀₀₀ la perméabilité de la carboxyfluorescéine hydrophile est réduite dans la solution tampon. En revanche, la fuite spontanée du bromure d'éthidium plus amphiphile n'a pas été affectée par l'inclusion du DSPE-PEG₂₀₀₀ (Silvander *et al.*, 1998). Egalement, l'augmentation de la concentration molaire de DMPE-PEG dans les liposomes réduit significativement la cinétique de libération de la guanosine encapsulée. Les chercheurs ont également constaté que le mécanisme de libération de la guanosine est modifié, passant en augmentant le taux de lipide-PEG, d'un mécanisme de diffusion contrôlée à un mécanisme interfacial contrôlé. L'ampleur de cet effet est directement dépendante de la MM du PEG (Er *et al.*, 2009).

3.4. Accumulation tumorale par effet EPR

Du fait de leur circulation prolongée dans le compartiment sanguin, les liposomes PEGylés peuvent s'accumuler de manière passive dans les tumeurs solides par effet de perméabilité et de rétention accrue (EPR) si leurs caractéristiques le permettent. Les premières manifestations de l'accumulation des liposomes dans les régions de perméabilité vasculaire augmentée chez les humains i.e. les tissus infectés et enflammés et les tumeurs ont été publiées dans un article paru en 1985 (Morgan *et al.*, 1985) ainsi que dans un deuxième en 1988 (Presant *et al.*, 1988). L'effet EPR au niveau des tumeurs est la conséquence de la microvascularisation fenêtrée qui présente de larges ouvertures (jusqu'à 500 nm) qui permettent aux liposomes de quitter le flux sanguin et gagner la matrice extracellulaire (MEC) tumorale par extravasation, combinée à un drainage lymphatique déficient (Yuan *et al.*, 1995). Cet effet a été appelé l'effet de la perméabilité et de la rétention accrue (en anglais « enhanced permeation and retention », EPR) par Maeda. Il découle de la différence de perméabilité vasculaire entre les tissus sains et les tissus tumoraux qui entraîne une accumulation préférentielle des liposomes dans les tumeurs. Le tableau 2 résume les caractéristiques de l'effet EPR.

Tableau 2. Profil et caractéristiques de molécules ou de vecteurs pour bénéficier de l'effet EPR.

Caractéristiques	Commentaires
Masse Molaire	40 kDa < MM < 800 kDa
Biocompatibilité	Absence de : coagulation, interaction avec les composants vasculaires et sanguins, lyse cellulaire, interaction avec le SPM
pH / charge de surface	Faiblement acide et cationique (vecteurs polycationiques disparaissent rapidement de la circulation)
Laps de temps requis pour observer l'effet EPR	Plusieurs heures chez la souris avec une tendance observée au bout des premières 30 min (PA libres : quelques minutes après infusion)
Temps de rétention dans la tumeur	Jours à semaines (PA libres : quelques min seulement)

3.5. Contribution de l'effet EPR au ciblage passif des tumeurs

L'utilisation de liposomes Stealth® dans le domaine de l'oncologie s'appuie énormément sur l'effet EPR qui permet d'expliquer l'accumulation tumorale suite à l'extravasation et leur diffusion au sein de la MEC. Néanmoins, l'effet EPR est très hétérogène (Lammers *et al.*, 2012; Maeda, 2012; Needham *et al.*, 2013) et son rôle en oncologie est probablement surestimé. Les deux principaux aspects de l'imperfection de l'effet EPR démontrés par les dernières recherches se situent essentiellement au niveau de l'extravasation vasculaire et de la pénétration cellulaire des nanovecteurs suite à la diffusion dans la MEC de la tumeur. Effectivement, au sein de la tumeur, il existe d'énormes différences en ce qui concerne la perméabilité vasculaire à cause

de la présence de zones où des particules de 200 nm sont capables d'extravaser, alors que dans d'autres parties, des molécules de la taille de l'albumine (i.e. 3-4 nm) sont incapables de passer dans l'interstice. En effet, dans ces zones d'imperméabilité vasculaire, soit le revêtement endothélial est intact, soit la perméabilité vasculaire est contrecarrée par la présence d'un revêtement péri-vasculaire dense, constitué de péricytes, cellules musculaires lisses et/ou fibroblastes. La variabilité inter-tumorale joue aussi son rôle. Toutes les tumeurs ne sont pas perméables aux nanovecteurs. Certaines tumeurs humaines surexpriment le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, initialement décrit comme le facteur de perméabilité vasculaire) ce qui les rend très perméables aux nanovecteurs. D'autres sont hypervascularisées ce qui augmente la probabilité statistique que certains vaisseaux soient perméables. Un exemple typique est le sarcome de Kaposi qui est connu pour contenir un grand nombre de vaisseaux perméables ce qui justifie sa réponse au traitement à ciblage passif suite à l'effet EPR qui y existe.

En outre, la caractérisation de l'effet EPR se base sur les modèles animaux utilisés en recherche. Néanmoins, la plupart des tumeurs se développent beaucoup plus rapidement chez les rongeurs par rapport à l'homme. Par exemple, des cellules tumorales inoculées en sous-cutané chez la souris se développent sous forme d'une tumeur d'environ 0,5 g en 2 à 4 semaines. Ceci reviendrait chez l'homme à une tumeur de 1 à 2 kg, qui prendrait des années à se développer. En raison de cette croissance rapide, les vaisseaux sanguins dans les tumeurs de souris ont tendance à être beaucoup plus perméables que leurs homologues humains. Cela peut conduire à un effet EPR sans doute plus important dans les modèles animaux et à une surestimation de l'effet EPR que chez les patients.

Plusieurs solutions ont été envisagées afin d'aborder cette hétérogénéité de l'effet EPR. L'utilisation de vecteurs d'agents de contraste (théranostique) afin de contrôler leur accumulation dans la tumeur, et ainsi présélectionner les patients et de ne traiter que ceux qui présentent une accumulation importante du vecteur au niveau tumoral. En outre, sur le plan pharmacologique des PA tels que les médiateurs de l'inflammation peuvent être utilisés en pré-traitement pour améliorer l'extravasation et la pénétration, pourvu qu'ils soient administrés à des doses suffisamment élevées pour perméabiliser les vaisseaux sanguins de la tumeur sans engendrer d'effets indésirables systémiques.

D'autre part, la forte densité de cellules tumorales et la pression interstitielle élevée entravent la diffusion de vecteurs à travers la MEC et les stoppent au bout d'une ou deux couches cellulaires. Popovic *et al.* (Popović *et al.*, 2010) ont démontré que seules des nanoparticules de taille 12 nm injectées par voie IV ont pu pénétrer correctement dans la MEC, alors que les plus

grosses particules (60 et 125 nm) ont été accumulées dans les zones péri-vasculaires. Ces résultats suggèrent fortement l'adaptation de la taille des vecteurs à un compromis entre une circulation sanguine prolongée et l'extravasation et la pénétration cellulaire.

Plusieurs alternatives offrent la possibilité de surmonter la barrière de la diffusion et de la pénétration cellulaire des nanovecteurs. A titre d'exemple, les liposomes thermosensibles (LTS) qui libèrent leur charge de PA de faible MM dans les microvaisseaux ou dans l'espace péri-vasculaire de la tumeur chauffée. Ces PA peuvent ensuite diffuser facilement et pénétrer profondément dans la tumeur. En plus, les nanoparticules d'environ 100 nm dites multicouches (en anglais « multistages ») qui assurent un temps de circulation prolongé grâce à leur taille relativement importante, mais qui après extravasation sont dégradées par les protéases de la MEC en des nanoparticules d'environ 10 nm ce qui permet une pénétration accrue dans la tumeur et une meilleure accumulation intratumorale. Par ailleurs, les traitements pharmacologiques par les inhibiteurs de la fibrose et les enzymes dégradant la MEC améliorent la pénétration des nanovecteurs. Par exemple, le traitement concomitant avec l'inhibiteur du facteur TGF- β (transforming growth factor β) inhibe la fibrose dans le micro-environnement de la tumeur et empêche les péricytes de recouvrir les vaisseaux sanguins de la tumeur, ce qui améliore sensiblement à la fois l'extravasation et la pénétration de liposomes. Egalement, le pré-traitement avec la collagénase (enzyme qui dégrade le collagène, composant majeur de la MEC des tumeurs), augmente la pénétration tumorale des anticorps et des nanoparticules virales. De même, le pré-traitement des tumeurs avec la relaxine, hormone qui modifie la structure du collagène, donne lieu à une augmentation de la pénétration d'anticorps et de macromolécules. La radiothérapie est aussi connue pour être capable d'augmenter à la fois l'extravasation, par l'intermédiaire de l'induction de l'expression des facteurs VEGF et EGF (facteur de croissance épidermique), et la pénétration de nanovecteurs, par l'intermédiaire de l'abaissement de la pression du fluide interstitiel. Le tableau 3 résume les contraintes liées à l'effet EPR et les alternatives disponibles.

Tableau 3. Contraintes de l'effet EPR et solutions proposées. Adapté de Lammers *et al.* 2012 (Lammers *et al.*, 2012).

Niveau du problème	Variabilité	Hétérogénéités/Contraintes physiologiques	Solutions
Extravasation	Intratumorale/ Intra-individuelle	-Présence de zones de perméabilité et d'imperméabilité vasculaire -Espace péri-vasculaire riche en péricytes, muscles lisses, fibroblastes qui réduisent le phénomène d'extravasation	-Théranostique : imagerie pré-thérapeutique de l'effet EPR pour présélectionner des candidats éligibles -Pharmacologie : médiateurs de l'inflammation (histamine, TNF-α ^a)
	Inter-tumorale	-Physiopathologie et anatomie de la tumeur : état de vascularisation de la tumeur (VEGF)	
	Interindividuelle		
	Entre modèle animal et l'homme	-Animal : croissance tumorale plus rapide que chez l'homme -Développement d'endothélium vasculaire tumoral peu/pas différencié (i.e. vaisseaux fenestrés) -Développement d'espace péri-vasculaire tumoral peu/pas différencié (i.e. peu de péricytes, muscles lisses, fibroblastes)	
Extravasation et pénétration cellulaire	Taille des vecteurs	-Densité cellulaire tumorale élevée -Pression interstitielle élevée -Blocage de la diffusion des vecteurs après une ou deux couches de cellules	-Innovation : LTS (le PA libéré pénètre profondément dans la tumeur) ; nanoparticules « multicouches » de 100 nm -Co- ou pré-traitement pharmacologique avec les : médiateurs de l'inflammation (histamine, TNF-α ^a), modificateurs de la MEC (inhibiteur du TGF-β, collagénase, relaxine) -Radiothérapie : augmentation de l'extravasation (induction du VEGF et du EGF) et de la pénétration (réduction de la pression interstitielle)

^aTNF- α = Facteur de nécrose tumorale alpha

Par conséquent, l'hétérogénéité de l'effet EPR limite sa validité universelle (Maeda, 2012) et impose des mesures pré-thérapeutiques en vue de contourner ces limites et promouvoir l'extravasation, la pénétration et la distribution des liposomes dans la tumeur afin qu'ils

produisent leur effet thérapeutique. Nous verrons cela plus loin dans le contexte de l'utilisation des LTS.

Pour conclure, idéalement, les liposomes transportent les PA anticancéreux tout au long de leur circulation dans le sang et ne les libèrent qu'au niveau de la tumeur. Par ce moyen, les liposomes protègent les PA du métabolisme plasmatique. En outre, une fois encapsulé, le PA perd ses propriétés inhérentes et acquiert celles de son vecteur. Par conséquent, un PA encapsulé suit les caractéristiques de circulation, distribution et clairance du liposome (Gabizon, 1992; Arulsudar *et al.*, 2003). En effet, en raison de leur taille (50-150 nm), les liposomes sont incapables de franchir l'endothélium sain et de pénétrer la MEC, ce qui évite par conséquent l'accumulation du PA dans les tissus sains. En revanche, la présence d'endothélium vasculaire fenêtré au niveau de la tumeur permet l'extravasation des liposomes, dont le diamètre moyen est < 200 nm. La présence simultanée d'un drainage lymphatique défectueux, entraîne l'accumulation des liposomes au niveau de la MEC. En conséquence, le volume de distribution du PA est réduit d'une façon significative. La réduction de l'accumulation du PA dans les tissus sains et l'augmentation de sa présence au niveau de la tumeur contribuent à la réduction des effets indésirables des anticancéreux. D'autre part, contrairement à la forme libre du PA, l'augmentation du temps de présence du PA encapsulé dans l'organisme due à la circulation prolongée des liposomes, favorise aussi l'augmentation de l'accumulation du PA au niveau de la tumeur. Il peut en résulter une efficacité thérapeutique accrue et ainsi un index thérapeutique augmenté pourvu que le PA soit biodisponible, c'est-à-dire libéré des liposomes.

3.6. Avantages et inconvénients des liposomes Stealth®

L'avantage principal des liposomes PEGylés est leur longue durée de circulation avec des demi-vies de 15 à 24 h chez les rongeurs et aussi élevée que 45 h chez l'homme (Moghimi and Szebeni, 2003). En conséquence, plusieurs formulations de liposomes Stealth® ont atteint la phase des essais cliniques (Allen and Cullis, 2013), voire la mise sur le marché comme pour le Doxil® (USA)/Caelyx® (Europe) qui est une formulation liposomale PEGylée de doxorubicine et le Daunoxome® qui est une formulation liposomale PEGylée de daunorubicine. Cependant, la modification de la pharmacocinétique et la biodistribution des liposomes s'effectue sans amélioration du ciblage cellulaire. La pharmacocinétique des liposomes Stealth® est non saturable, log-linéaire indépendante des propriétés telles que la taille, la charge de surface, la dose de lipides administrée (Drummond *et al.*, 1999). A cette modification de la pharmacocinétique, s'ajoute l'inhibition des interactions non spécifiques et spécifiques des protéines avec la surface des liposomes, de l'auto-agrégation et de la fusion des liposomes dont

les mécanismes d'actions ont été décrits précédemment (Allen *et al.*, 2002; Moghimi and Szebeni, 2003; Immordino *et al.*, 2006).

Il faut cependant citer un certains nombres d'inconvénients qui sont entre autres liés aux lipides-PEG que l'on peut attribuer tant à la partie phospholipidique qu'à la partie PEG. En effet, outre que leur synthèse est d'un coût élevé, des réactions d'hypersensibilité et de production d'anaphylatoxine associées à des troubles cardiopulmonaires *in vitro* ont été attribuées à la charge négative du groupement phosphate des glycérophospholipides-PEG qui activent d'une manière concentration-dépendante les voies classique et alternative du système du complément (Moghimi *et al.*, 2006; Moghimi *et al.*, 2010; Nag *et al.*, 2013). L'activation du complément produit les anaphylatoxines C3a et C5a qui se fixent à leurs récepteurs exprimés à la surface des mastocytes dans l'intima des artères coronaires et périvasculaires, à proximité des myocytes. L'activation des récepteurs induit la libération d'une variété de médiateurs inflammatoires et de molécules vaso-actives par les mastocytes. A savoir, la libération des eicosanoïdes, en particulier le thromboxane A₂, qui pourraient induire une vasoconstriction pulmonaire et coronaire, qui peuvent être combinées avec la formation de microthrombi et microembolisation de capillaires par agrégation des neutrophiles et des plaquettes. En outre, C3a peut également activer les plaquettes, augmentant ainsi le risque d'agrégation. Cependant, C5a est 100 fois plus puissant que la fraction C3a, et peut augmenter la thrombogénicité par une régulation positive de l'expression du facteur tissulaire et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène dans divers types de cellules. Dans l'ensemble, la résultante de ces réactions est une réduction de la précharge cardiaque et du flux coronaire engendrant une ischémie myocardique, une diminution de la contractilité, une réduction du débit cardiaque et une hypotension qui peuvent entraîner un collapse circulatoire et la mort si ce n'est pas résolu spontanément. Cette propriété des liposomes contenant des lipides-PEG à activer le complément et à engendrer une micro-agrégation plaquettaire complément-dépendante est partagée avec ceux constitués de phospholipides anioniques conférant une charge nette anionique aux liposomes. Par ailleurs, le PEG est capable d'induire la synthèse des anticorps anti-PEG de la classe des IgM impliqués dans l'élimination des liposomes PEGylés administrés par voie IV ce qui compromet la biodisponibilité du PA encapsulé. Le devenir biologique du PEG dans le corps après la désintégration de liposomes PEGylés n'est pas clair. Il est décrit que les PEG d'une MM inférieure à 400 Da sont sujets à l'oxydation catalysée par l'alcool déshydrogénase, ce qui produit des métabolites diacides et hydroxy acides toxiques (Herold *et al.*, 1989). Alors que les PEG ayant une MM supérieure à la limite de la clairance rénale (30-50 kDa) ne sont pas biodégradables (Pasut and Veronese, 2007).

D'autre part, une chaîne de PEG possède à la fois des caractéristiques hydrophiles et hydrophobes. En conséquence, son caractère hydrophobe empêche l'hydratation des têtes polaires des phospholipides de la bicouche entraînant ainsi une faible encapsulation, une déstabilisation des liposomes et une fuite probable du PA encapsulé (Unezaki *et al.*, 1994). Par conséquent, plusieurs amphiphiles contenant des sphingolipides, des acides gras et leurs sels dérivés, du CHOL conjugués avec des polymères tels que le polyoxyéthylène et de polyglycérol ou encore des lipopolymères à base de vinyl, poly (2-oxazoline) ou polyacide-aminés ont été rapportés et semble constituer des alternatives intéressantes (Yuda *et al.*, 1996). En outre, la présence de macromolécules telles que le PEG à la surface des liposomes peut réduire les interactions des liposomes avec les cellules et entraver leur pénétration dans le tissu tumoral, ce qui réduit éventuellement l'accumulation de liposomes dans la tumeur. En effet, Hong *et al.* ont démontré que l'utilisation de liposomes PEGylés n'a pas d'avantages en terme de maximisation de l'accumulation de liposomes encapsulant la doxorubicine dans les sites tumoraux comparés aux liposomes non PEGylés (Hong *et al.*, 1999).

Un autre inconvénient réside dans la circulation systémique prolongée, combinée au risque accru d'une extravasation de ces liposomes dans les tissus non pathologiques ce qui peut conduire à une toxicité indésirable. Par exemple, l'administration du Caelyx® provoque une toxicité cutanéomuqueuse sévère lors du traitement du cancer métastatique du sein et de la prostate (Lotem *et al.*, 2000). Cet effet secondaire est dénommé « syndrome main-pied » car il provoque une nécrose des téguments réversible à l'arrêt du traitement qui, cependant, constitue la toxicité limitant la dose. Ce syndrome est supposé être dû à l'extravasation des liposomes PEGylés chargés de doxorubicine dans les tissus cutanés où ils libèrent lentement la doxorubicine, ce qui endommage les couches basales de la peau. Par ailleurs, une étude réalisée par Hong *et al.* qui porte sur la comparaison entre deux formes liposomales, PEGylée et non PEGylée, de doxorubicine n'a pas montré de différence significative en termes d'efficacité anticancéreuse et de survie en dépit d'une aire sous la courbe (en anglais « area under curve », AUC) plus élevée des liposomes PEGylés (Hong *et al.*, 1999).

4. Liposomes de 3^{ème} génération

4.1. Définition

Les liposomes à ciblage actif sont ceux dont la surface est décorée à l'aide d'un ligand spécifique, tel que les anticorps monoclonaux ou des fragments d'anticorps, les peptides, les facteurs de croissance, les glycoprotéines ou les glucides, capable de reconnaître un récepteur

cellulaire spécifique surexprimé au niveau du site cible en vue d'augmenter la sélectivité de l'interaction liposome-cellules et de favoriser l'internalisation des liposomes dans des cellules cibles par endocytose médiée par ce récepteur.

La méthode de préparation de liposomes à ciblage actif la plus largement utilisée consiste à mélanger les liposomes préformés composés d'un lipide-PEG comportant un groupe maléimide à l'extrémité de la chaîne PEG avec des fragments d'anticorps (scFv ou Fab) à groupe thiol réduit. Les fragments d'anticorps seront liés à la surface des liposomes par l'intermédiaire du groupe maléimide formant ainsi une liaison thioéther stable (Immordino *et al.*, 2006).

4.2. Approches du ciblage actif

Deux approches de ciblage ont été investiguées : le ciblage des cellules tumorales et le ciblage des cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux.

L'avantage du ciblage actif des cellules tumorales réside dans l'amélioration de l'internalisation des liposomes chargés en PA dans les cellules cibles (Kirpotin *et al.*, 2006). Les inconvénients proviennent du fait qu'un certain nombre d'obstacles anatomiques et physiologiques doivent être surmontés avant que ces liposomes ciblés se fixent aux cellules cancéreuses. Il s'agit notamment de la présence de péricytes, cellules musculaires lisses et des couches de fibroblastes entre les cellules endothéliales et tumorales, de la densité cellulaire élevée à l'intérieur de tumeurs malignes solides, et de la pression interstitielle élevée qui est typique des tumeurs (Jain and Stylianopoulos, 2010). Il en résulte que ces liposomes ciblés ont des difficultés à trouver leurs cellules cibles, et ne parviennent généralement pas à démontrer un avantage par rapport aux liposomes à ciblage passif. La distribution et l'accumulation des liposomes dans la tumeur se fait par extravasation (ciblage passif) qui est un mécanisme commun aux liposomes de 2^{ème} et 3^{ème} génération et par conséquent aucune amélioration de la distribution tumorale n'est apportée par le ciblage actif (Riviere *et al.*, 2011). En outre, la libération intracellulaire est uniquement une exigence pour l'activité thérapeutique des macromolécules (siARN, peptides) qui sont incapables de franchir la membrane plasmique (Lammers *et al.*, 2012). L'internalisation peut être médiée dans ce cas via des ligands spécifiques ou par incorporation d'agents fusogènes (lipides, peptides, etc) au niveau de la bicouche capables de fusionner avec la membrane cellulaire, ou de la perturber, pour aboutir à la libération cytoplasmique du PA (Allen and Cullis, 2013). Tandis que les PA hydrophobes de faible MM tels que la doxorubicine ou la vincristine peuvent franchir la membrane plasmique des cellules sous la forme non chargée par diffusion passive selon leur gradient de concentration, certains PA hydrophiles utilisent des transporteurs membranaires de la cellule. Par exemple, la cytosine arabinoside pénètre dans les cellules par l'intermédiaire du

transporteur de nucléosides. Par ailleurs, le ciblage actif augmente l'internalisation des liposomes par les cellules cibles en fonction de facteurs tels que la perméabilité du système vasculaire (Jain and Stylianopoulos, 2010), la pénétrabilité de la tumeur (Jain and Stylianopoulos, 2010), la densité de l'antigène (Park *et al.*, 2002) et l'affinité du ligand pour le récepteur (Orcutt *et al.*, 2012). Il en résulte une amélioration thérapeutique absente ou faible. Par ailleurs, les anticorps ou leurs fragments, ou tout autre ligand ne doivent pas être couplés aux têtes polaires des lipides de la bicouche. Le couplage des ligands doit avoir lieu à l'extrémité des chaînes de PEG greffées à la surface des liposomes (Ahmad *et al.*, 1993) afin que l'anticorps soit accessible au récepteur cellulaire et que la liaison ligand-récepteur ne soit pas masquée par la présence de PEG (Maruyama *et al.*, 1995). Enfin, l'efficacité de ciblage est liée à la densité des récepteurs à la surface cellulaire (Park *et al.*, 2002). Cette densité apparente du récepteur peut être augmentée en combinant des agents de ciblage qui se lient à des combinaisons de ligands (Laginha *et al.*, 2005). À l'heure actuelle, la seule formulation d'immunoliposomes en cours d'essais cliniques est le liposome PEGylé chargé de doxorubicine ciblé avec le fragment F(ab')₂ de l'anticorps monoclonal humain GAH, qui est capable de reconnaître les cellules du cancer de l'estomac, du côlon et du sein (Matsumura *et al.*, 2004).

En vue de surmonter partiellement les limitations mentionnées ci-dessus (i.e. barrières anatomiques) en ce qui concerne le ciblage actif des cellules tumorales, certains liposomes chargés de PA anticancéreux ont été fonctionnalisés avec des ligands qui reconnaissent des récepteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux dans le but d'exercer leur effet cytotoxique sur les cellules endothéliales et de priver ainsi les cellules tumorales d'oxygène et de nutriments acheminés via le sang. Le ciblage actif des néovaisseaux est considéré potentiellement plus efficace que le ciblage actif des cellules tumorales. En effet, le ciblage actif des cellules endothéliales ne dépend pas de l'extravasation ni de la pénétration des liposomes fonctionnalisés à travers les péricytes, les cellules musculaires lisses et/ou les couches de fibroblastes. De plus, ces liposomes rencontrent fréquemment leurs récepteurs cibles au cours de leur circulation sanguine et ne sont pas inhibés par la densité élevée des cellules tumorales et la pression élevée du fluide interstitiel. Les liposomes qui ciblent les néovaisseaux trouvent, fixent et tuent plus facilement leurs cellules cibles que les liposomes ciblant les cellules cancéreuses (Lammers *et al.*, 2012). En outre, les liposomes qui ciblent les néovaisseaux tumoraux peuvent aussi être conçus de manière à libérer le PA dans le système vasculaire de la tumeur lors de la liaison à leurs récepteurs, permettant ainsi au PA de faible MM de pénétrer profondément dans le tissu interstitiel de la tumeur. Des liposomes furtifs chargés de doxorubicine fonctionnalisés par la séquence peptidique arginine-glycine-acide

aspartique (RGD) en vue de cibler les intégrines surexprimées au niveau de l'endothélium angiogénique, ont montré une efficacité thérapeutique intéressante sur le neuroblastome, le mélanome et le cancer du côlon dans des modèles *in vivo* (Schiffelers *et al.*, 2003).

5. Liposomes thermosensibles

5.1. Pertinence des liposomes thermosensibles en oncologie

L'optimisation du taux de libération des PA encapsulés dans les liposomes est cruciale pour parvenir à une efficacité thérapeutique maximale et cela pour deux raisons fondamentales. La première est liée à la perméabilité des liposomes au PA pendant son acheminement dans le sang vers la tumeur. Si la perméabilité est importante, aucun avantage thérapeutique par rapport au PA libre ne sera obtenu. Par ailleurs, si les liposomes accumulés dans le tissu tumoral ne libèrent pas suffisamment leur contenu en PA, la concentration thérapeutique efficace ne sera pas atteinte. Les liposomes qui ont été homologués par la FDA pour une utilisation en clinique dans le traitement du cancer reposent tous sur une libération passive et lente de leur contenu. Une libération active du PA, une fois que les liposomes ont atteint la tumeur, est intéressante. Elle nécessite cependant un facteur déclenchant la libération par déstabilisation rapide de la bicouche. Plusieurs études ont indiqué que les LTS associés à une source d'hyperthermie (HT) suffisamment élevée pour induire une déstabilisation de leur bicouche lipidique, libèreraient plus massivement et plus rapidement le PA encapsulé que leurs contreparties non sensibles à la température (Banno *et al.*, 2010; Al-Jamal *et al.*, 2012; Kheirrolomoom *et al.*, 2013; Needham *et al.*, 2013). Récemment, des essais *in vivo* réalisés par la société Celsion Corporation, sur une formulation liposomale thermosensible de doxorubicine (ThermoDox[®]) ont montré une accumulation de la doxorubicine dans la tumeur 5 fois plus élevée après une heure de chauffage à 42°C, que le contrôle non thermosensible (Caelyx[®]). Ces LTS permettent ainsi à de fortes concentrations de doxorubicine de se distribuer préférentiellement dans la tumeur cible (Celsion, 2014).

On distingue deux catégories de LTS : Les LTS dits traditionnels (LTST) et les LTS contenant un lysolipide (LTSL) :

Les LTST permettent une libération du PA anticancéreux à la T_m de la bicouche. Ainsi, les LTST qui se trouvent dans les microvaisseaux ou la MEC de la tumeur chauffée à une température équivalente à la T_m , libèrent le PA encapsulé. La cinétique de libération est intermédiaire. Ensuite, le PA libéré diffuse à travers la MEC tumorale et franchit la membrane cytoplasmique des cellules tumorales jusqu'à sa cible.

Les LTSL possèdent une composition lipidique particulière leur conférant la propriété de libérer le PA encapsulé d'une façon ultrarapide à une température avoisinant la T_m . La présence des lysolipides crée des défauts de structuration au sein de la bicouche. A une température avoisinant la T_m (dans les microvaisseaux de la tumeur chauffée), ces défauts membranaires sont les premiers à fondre, donnant lieu à un transport latéral des lipides. Ce qui permet aux lysolipides de prendre leur courbure préférée (i.e. micelle convexe), formant ainsi des nanopores. Ces nanopores favorisent la libération massive du PA encapsulé dans les microvaisseaux de la tumeur chauffée à une température équivalente à la T_m . Le PA subit ensuite une extravasation et diffuse dans la MEC tumorale et pénètre ainsi dans la cellule tumorale. Par conséquent, le principe des LTSL est analogue à une injection du PA anticancéreux par voie IV mais directement dans les microvaisseaux de la tumeur (Lammers *et al.*, 2012; Needham *et al.*, 2013).

La différence entre les deux catégories de LTS provient essentiellement de la différence de composition qui entraîne une différence de stabilité dans la circulation sanguine. Leurs différentes propriétés seront détaillées plus loin dans cette introduction. Dans cette partie nous nous intéressons aux propriétés fondamentales des LTS et à la libération de leur contenu en réponse à une HT.

5.2. Transition de phase gel-cristal liquide $L_{\beta'}$ - L_{α} : isomérisation *trans-gauche*

Certains phospholipides sont caractérisés par une température de transition de phase (T_m) en dessous de laquelle la bicouche des liposomes se trouve à l'état « gel » (solide ordonné SO) et au-dessus de laquelle la bicouche se trouve à l'état « cristal liquide » (liquide désordonné LD). Par exemple, dans le cas de la DPPC, à forte teneur en eau (40-50% H_2O en masse) en dessous de 37°C, la phase lamellaire « gel » ($L_{\beta'}$) prédomine et se caractérise par des chaînes hydrocarbonées étirées au maximum, parallèles entre elles et en conformation *trans*. Dans cette situation, la bicouche est rigide et faiblement perméable. Du fait de l'encombrement de la tête polaire de la DPPC (Delattre *et al.*, 1993), les chaînes sont inclinées de 33° par rapport à la normale à la bicouche (Figure 6). Une élévation de la température entraîne un accroissement de la mobilité moléculaire. La probabilité d'une isomérisation *trans-gauche* s'accroît alors. Au-dessus de 37°C, la phase $L_{\beta'}$ se transforme en une phase $P_{\beta'}$ dans laquelle la structure lamellaire est conservée, mais la bicouche présente des ondulations périodiques. Ces ondulations sont probablement dues à un glissement des chaînes les unes par rapport aux autres, permettant d'accommoder l'augmentation de surface de la tête polaire. Au-delà de la T_m de 41,5°C, les phospholipides passent d'une configuration ordonnée à une configuration désordonnée (*gauche*) où les chaînes hydrocarbonées ne sont plus parallèles entre elles ni inclinées. Elles

deviennent plus flexibles et en oscillation autour d'un axe moyen perpendiculaire au plan de la bicouche phospholipidique. Dans ce contexte, l'épaisseur de la bicouche diminue. Elle est dite en phase lamellaire « cristal liquide » (L_α). C'est cette phase que l'on trouve principalement dans les membranes biologiques. La bicouche est par conséquent plus perméable vis-à-vis des molécules encapsulées dans la cavité aqueuse (Delattre *et al.*, 1993).

La T_m dépend de la longueur et de la saturation des chaînes acyles des phospholipides. Elle s'abaisse quand la longueur des chaînes acyles diminue pour une même tête polaire car les interactions de Van Der Waals diminuent, ou quand le nombre de doubles liaisons au niveau des chaînes acyles augmente car cela défavorise les interactions entre chaînes (Tableau 4). Les deux phases, L_β et L_α , résultent d'une rotation possible autour des liaisons C-C des chaînes hydrocarbonées. D'autres mouvements sont possibles au sein de la bicouche phospholipidique en phase « cristal liquide » tels que la diffusion rotationnelle des phospholipides sur eux-mêmes, la diffusion latérale dans le feuillet dont ils font partie ou, beaucoup plus rarement, la diffusion entre deux feuillets (flip-flop) (Rickwood and Hames, 1989) mais ces points ne seront pas développés ici.

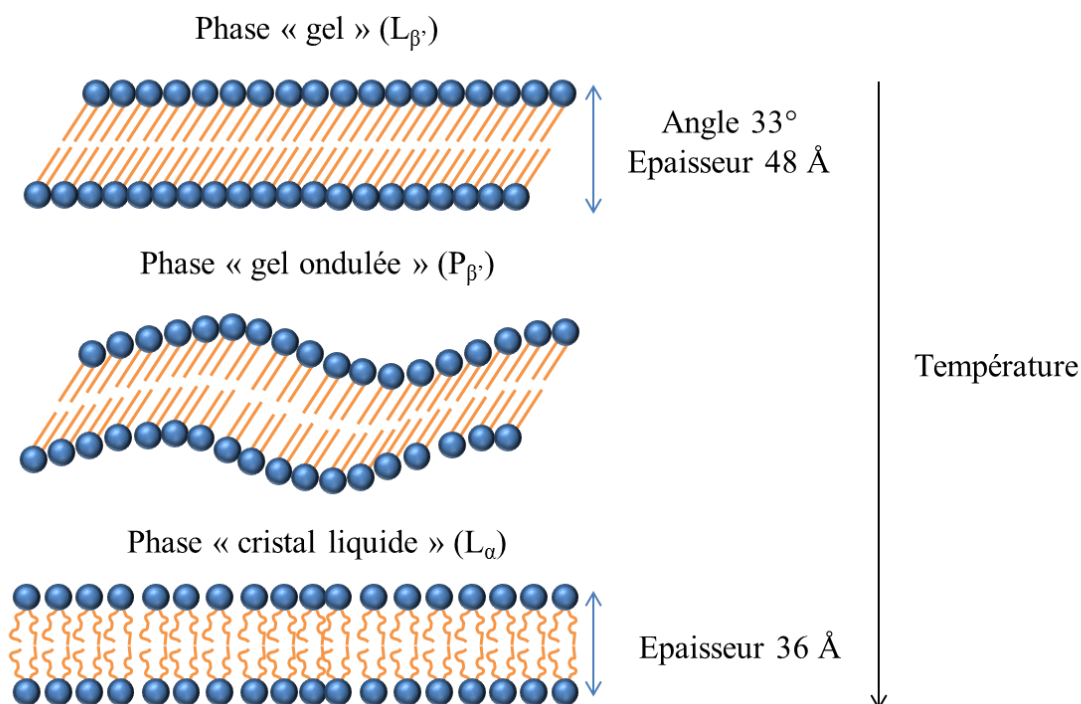


Figure 6. Transition de phase gel-cristal liquide L_{β} - L_{α} des phospholipides au sein de la bicouche lipidique. Exemple de la DPPC.

Tableau 4. Tableau récapitulatif des températures de transition de phase principale des différents phospholipides synthétiques. Adapté de Delattre *et al.* 1993 (Delattre *et al.*, 1993) et Ishida *et al.* 2002 (Ishida *et al.*, 2002).

Phospholipide	Abréviation	Longueur chaîne acyle : nombre d'insaturations	T_m (°C)
Dioléyl phosphatidylcholine	DOPC	18 : 1, 18 : 1	-22
Dimyristoyl phosphatidylcholine	DMPC	14 : 0, 14 : 0	23
1-Myristoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine	MPPC	14 : 0, 16 : 0	27
Dipalmitoyl phosphatidylcholine	DPPC	16 : 0, 16 : 0	41,5
Dipalmitoyl phosphatidylglycérol	DPPG	16 : 0, 16 : 0	41
Phosphatidylcholine de soja hydrogénée	HSPC	18 : 0, 18 : 0	50-60
Distéaroyl phosphatidylcholine	DSPC	18 : 0, 18 : 0	54,5
Dipalmitoyl phosphatidyléthanolamine	DPPE	16 : 0, 16 : 0	63
Distéaroyl phosphatidyléthanolamine	DSPE	18 : 0, 18 : 0	74

5.3. Lipides utilisés pour la formulation de liposomes thermosensibles

Les LTS sont souvent composés d'une combinaison de deux ou trois composants lipidiques ayant chacun une fonction spécifique relative aux propriétés de stabilité et de libération envisagées. Parmi ces composés, on distingue, la DPPC, le CHOL, le DSPE-PEG et les lysolipides. Nous verrons dans ce paragraphe comment chacun d'entre eux affecte les propriétés de thermosensibilité des liposomes.

5.3.1. 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

La 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DPPC) ($C_{40}H_{80}NO_8P$) est un phospholipide bicaténaire zwitterionique thermotrope constituant majeur des membranes biologiques. La structure de la DPPC possède une partie hydrophile : la choline et le phosphate, et une partie hydrophobe composée de deux acides gras saturés (Figure 7).

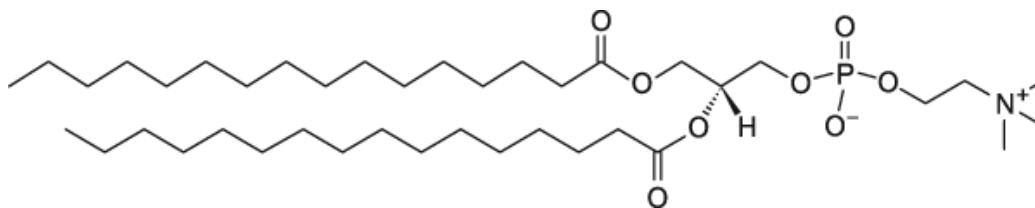


Figure 7. Structure chimique de la DPPC. Adaptée de Avanti Polar Lipids.

La DPPC se caractérise par un certain nombre de propriétés qui font d'elle le phospholipide idéal pour la conception de LTS (Yatvin *et al.*, 1978; Gaber *et al.*, 1995; Viroonchatapan *et al.*, 1997; Kong *et al.*, 2000; Chiu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010; Pradhan *et al.*, 2010; de Smet *et al.*, 2011; Djanashvili *et al.*, 2011; Al-Jamal *et al.*, 2012):

1. Une géométrie cylindrique ($0,5 < P < 1$) qui fait que la plupart des phases obtenues ($L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$, L_{α}) sont du type lamelles vésiculaires (Delattre *et al.*, 1993).
2. Une T_m de $41,5 \pm 0,5^{\circ}C$ qui fait qu'une HT locale modérée ($39-42^{\circ}C$) (Kong *et al.*, 2001; Hildebrandt *et al.*, 2002; Mills and Needham, 2005) déclenche la transition de phase réversible de la bicouche de l'état de faible perméabilité « gel » à l'état de plus grande perméabilité « cristal liquide » et entraîne par la suite la libération immédiate et locale du PA encapsulé au niveau du site défini (Yatvin *et al.*, 1978).
3. Un avantage majeur découle de la valeur de T_m légèrement supérieure à la température physiologique car elle permet de rester dans la marge d'HT cliniquement acceptable ($39-42^{\circ}C$) dans le cadre d'une application envisageable chez l'homme.

Cependant, un inconvénient majeur de la DPPC réside dans le fait que les liposomes qui sont composés purement de ce phospholipide libèrent leur contenu lentement et de manière incomplète (Gaber *et al.*, 1995). L'addition d'autres phospholipides tels que la DSPC permet d'augmenter la libération des PA. Cependant, la DSPC augmente légèrement la T_m entre 43 et $45^{\circ}C$ (Gaber *et al.*, 1995) ce qui nécessite d'appliquer une HT plus importante.

5.3.2. 3 β -Hydroxy-5-cholestène ou cholestérol

Le cholestérol (CHOL) ($C_{27}H_{45}OH$) est un stérol présent dans les membranes biologiques à un rapport molaire qui varie entre 0,1 et 1 en fonction du type cellulaire (Figure 8, gauche). Le CHOL ne forme pas en soi des phases lamellaires mais il peut s'incorporer au sein de bicouches

phospholipidiques (Rickwood and Hames, 1989). C'est une molécule amphiphile qui s'insère dans les bicouches en orientant la partie polaire du noyau stéroïde vers la surface aqueuse et la chaîne aliphatique parallèlement aux chaînes acyles au centre de la bicouche (Figure 8, droite). Au sein de la bicouche, le groupement 3 β -hydroxyle est situé au même niveau que les groupements carboxyles des fonctions esters des chaînes hydrocarbonées. Comme la surface occupée à la fois par les chaînes acyles et stéroïdes est supérieure ou égale à celle occupée par les têtes polaires des phospholipides, l'inclinaison des chaînes acyles observée dans les bicouches formées de phospholipides seuls afin de favoriser les interactions hydrophobes n'est plus nécessaire.

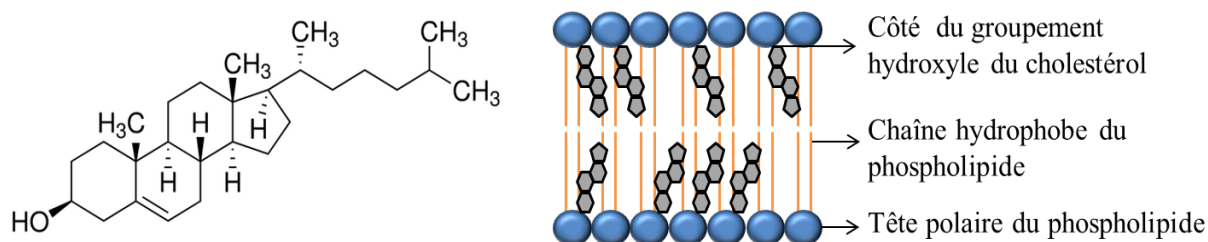


Figure 8. Structure chimique du CHOL (gauche). Représentation schématique de l'insertion du CHOL au niveau de la bicouche (droite).

L'effet du CHOL au sein de la bicouche lipidique est fonction de l'état physique de la bicouche :

- L'incorporation du CHOL dans les LTS composés de DPPC peut compromettre la propriété de thermosensibilité d'une façon dose-dépendante. Le CHOL a un paramètre d'empilement d'environ 1,2. Lorsqu'il est ajouté à une bicouche lipidique à un rapport molaire de plus de 30% et moins de 50%, il provoque la transformation de la bicouche lipidique d'un état SO à un état « cristal liquide » mais hautement ordonné (LO) (Bloom *et al.*, 1991). En raison de son faible volume libre, la bicouche en phase LO est moins sensible aux variations de température. Ainsi, le CHOL est capable de réduire l'enthalpie de transition de phase de la DPPC d'une façon concentration-dépendante et de l'abolir complètement à des concentrations au-delà de 30 mol% (Semple *et al.*, 1996).
- Les bicouches à l'état LO sont moins perméables, plus stables, plus rigides, et ont un plus faible degré d'hydratation des têtes polaires des phospholipides par rapport à une bicouche à l'état LD (Schroeder *et al.*, 2009).

- Le CHOL élargit la T_m de la DPPC ce qui pourrait provoquer une libération prématurée du contenu des LTS dans le sang avant d'atteindre leur site cible (Gaber *et al.*, 1995; Banno *et al.*, 2010).
- L'addition de CHOL à une bicouche de DPPC en phase « gel » affaiblit l'empilement des têtes polaires de la DPPC, provoque l'expansion des chaînes aliphatiques, et diminue la viscosité de la bicouche. La fluidité et la perméabilité de la phase « gel » ordonnée de la bicouche s'en trouvent augmentées. L'addition de CHOL à une bicouche de DPPC en phase « cristal liquide », par contre, réduit la liberté de mouvement des chaînes de la DPPC, provoque la « condensation » de la bicouche, augmente l'empilement et réduit la fluidité et la perméabilité de la bicouche (augmentation de la viscosité) (Rickwood and Hames, 1989).
- Finalement, l'incorporation du CHOL dans une bicouche composée de lipides insaturés à l'état « cristal liquide » stabilise la bicouche alors qu'il déstabilise une bicouche à l'état « gel » (Gaber *et al.*, 1995).
- *In vivo*, le CHOL augmente la demi-vie de circulation des liposomes. Cela est le résultat d'une double fonctionnalité du CHOL au sein de la bicouche. En premier lieu, le CHOL diminue la perméabilité de la membrane et lui permet une plus grande résistance à la déstabilisation par les composants sanguins. Deuxièmement, il a été démontré que les liposomes riches en CHOL possèdent une plus faible affinité pour la capture par les cellules de Kupffer hépatiques, ce qui suggère que le CHOL inhibe l'adsorption des opsonines sériques sur les liposomes (Semple *et al.*, 1996).

En somme, le CHOL joue un rôle considérable dans l'amélioration de la stabilité *in vitro* et *in vivo* des liposomes et l'augmentation de leur temps de circulation *in vivo*.

5.3.3. 1,2-distéaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-éthoxy(polyéthylène glycol)-2000]

Le 1,2-distéaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-[méthoxy(polyéthylène glycol)-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀) est un lipopolymère constitué du phospholipide DSPE (C₄₁H₈₂NO₈P) de géométrie conique (base du cône hydrophobe, $P > 1$) (Annexe 1) conjugué d'une façon covalente par une fonction méthoxy au PEG₂₀₀₀ (Figure 9). Le DSPE a été sélectionné pour réaliser des réactions de conjugaison en raison de son groupement ammonium quaternaire terminal caractérisé par une forte réactivité chimique et permettant la conjugaison avec d'autres molécules et polymères.

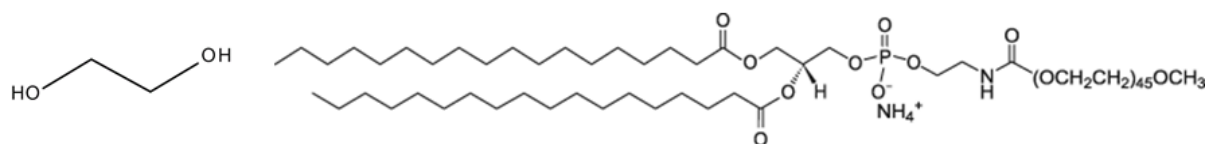


Figure 9. Structures chimiques de l'éthylène glycol (gauche) et du DSPE-PEG₂₀₀₀ (droite). Adaptée de Avanti Polar Lipids.

Le DSPE-PEG₂₀₀₀ étant amphiphile, les chaînes acyles agissent en tant que points d'ancrage incorporés dans la bicouche de liposome, tandis que les chaînes méthoxypolyéthylène glycol se localisent dans l'environnement aqueux. Le DSPE-PEG₂₀₀₀ est souvent introduit dans la composition des LTS à une concentration comprise entre 1 et 5 mol% avec un optimum de 5 mol% pour obtenir la furtivité comme nous l'avons vu précédemment (Li *et al.*, 2010).

Il augmente la perméabilité de la bicouche des LTS promouvant la libération du PA encapsulé à la T_m . Cependant, le mécanisme impliqué est variable en fonction du type de LTS. Une étude a porté sur l'influence du DSPE-PEG₂₀₀₀ inséré au sein de la bicouche sur la stabilité et le pourcentage de libération de la carboxyfluorescéine (hydrophile) encapsulée dans des LTST composés de DPPC/DSPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ mis en contact avec 90% de sérum. Dans ces conditions, la libération du marqueur fluorescent à 42°C augmente avec l'augmentation de la concentration molaire de DSPE-PEG₂₀₀₀ jusqu'à 6 mol%. Au-delà on ne voit plus de différence de la libération entre 37 et 42°C. La concentration molaire optimale de DSPE-PEG₂₀₀₀ a été estimée à 5 mol% à laquelle les LTST restent stables en dessous de 37°C, alors qu'ils libèrent presque 100% de leur contenu au bout d'une heure à 42°C (Li *et al.*, 2010). Une concentration comprise entre 1 et 5 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ confère donc une bonne stabilité alors que des concentrations plus élevées (6-10 mol%) provoquent la déstabilisation de la bicouche (Garg *et al.*, 2009) ainsi que la fuite de la sonde fluorescente à basse température (Li *et al.*, 2010). Les résultats *in vivo* semblent être cohérents avec ceux observés *in vitro*.

Des résultats similaires ont été obtenus avec des LTST composés de DPPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ encapsulant la doxorubicine. Le test de libération réalisé dans un tampon HEPES à 41,5°C a montré que l'inclusion du DSPE-PEG₂₀₀₀ favorise la libération de la doxorubicine. Le pourcentage de libération de la doxorubicine augmente proportionnellement en fonction de la concentration molaire de DSPE-PEG₂₀₀₀ jusqu'à 9 mol% au-delà desquels la libération de doxorubicine diminue (Needham *et al.*, 2013). L'augmentation de la perméabilité de la bicouche pourrait être due à la formation de nanopores par le DSPE-PEG₂₀₀₀. Cependant, le mécanisme d'inhibition de la libération de doxorubicine pour les fortes concentrations molaires de DSPE-PEG reste inexpliqué. Le mécanisme par lequel le DSPE-PEG₂₀₀₀ favorise la

libération n'est pas identique pour les deux types de LTS. Tandis qu'il n'est pas encore élucidé dans le cas des LTST, le mécanisme postulé dans le cas des LTSL est lié aux interactions avec les lysolipides comme nous le verrons plus bas. Enfin le DSPE-PEG₂₀₀₀ est capable de s'opposer à l'effet stabilisant du CHOL notamment sur la doxorubicine dans des LTST augmentant le pourcentage de PA libéré à 42°C en présence de 50% de plasma humain (Gaber *et al.*, 1995).

L'effet du DSPE-PEG₂₀₀₀ sur la T_m des LTS et leur thermosensibilité est cependant controversé et probablement fonction de leur composition. En effet, alors que certaines études ont montré que pour des concentrations en DSPE-PEG₂₀₀₀ variant entre 1 et 10 mol%, la T_m d'une formulation composée de DPPC/DSPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ reste inchangée (Li *et al.*, 2010), d'autres études ont démontré l'inverse, à une augmentation de la T_m de deux degrés à 2 mol% de DSPE-PEG₁₉₀₀ d'une formulation composée de DPPC/HSPC/CHOL/DSPE-PEG₁₉₀₀ par rapport à la même composition lipidique dépourvue de DSPE-PEG₁₉₀₀. La thermosensibilité à 42°C ne semble toutefois pas affectée par cette différence. Par ailleurs, dans le cas de liposomes à base de DPPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ à 4 mol%, ce dernier entraîne une augmentation de la T_m d'un degré et élargit le pic endothermique de transition de phase (Needham *et al.*, 2013). Le DSPE-PEG₂₀₀₀ augmente légèrement la T_m de la DPPC ce qui rend judicieux la mesure de la T_m pour chaque formulation liposomale.

5.3.4. Lysolipides

Les lysolipides sont des phospholipides monocaténaux ou lysophospholipides de géométrie conique (cône à base hydrophile, $P < 0,5$). La structure chimique du lysolipide 1-stéaroyl-2-hydroxy-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (MSPC) (C₂₆H₅₄NO₇P) qui est couramment additionné aux formulations de LTS est représentée sur la Figure 10.

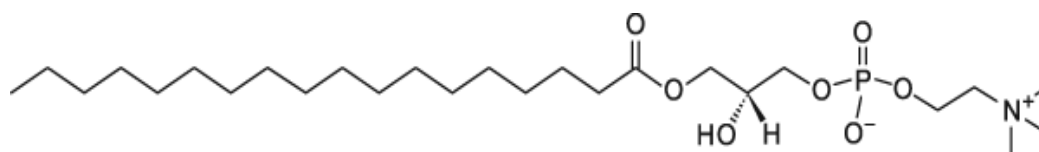


Figure 10. Structure chimique du MSPC. Adaptée de Avanti Polar Lipids.

Les lysolipides sont aussi nommés lipides porogènes parce qu'ils induisent la formation de nanopores d'un diamètre proche de 10 nm au sein de la bicouche lipidique dont la perméabilité à la T_m se trouve augmentée d'une manière très rapide. Deux mécanismes de perméabilisation par les lysolipides à la T_m ont été postulés (Mills and Needham, 2005; Banno *et al.*, 2010) :

1. En présence d'une bicouche lipidique de composition hétérogène (DPPC/MSPC/DSPE-PEG₂₀₀₀), il se crée des régions « défectueuses » ou des régions « qui fuient », appelées en anglais « grain boundaries », au sein de la phase « gel » de la bicouche. A la T_m , ces zones

se transforment rapidement pour former des nanopores toroïdaux dont les bords sont stabilisés par une ségrégation de lysolipides en forme de micelles qui résulte quant à elle de la diffusion latérale rapide des lysolipides au sein de la bicouche devenue fluide (Figure 11). Lors de l'addition de DSPE-PEG₂₀₀₀, ce dernier possédant une géométrie similaire au MSPC (cône à base hydrophile), Le DSPE-PEG₂₀₀₀ participe donc à la formation et à la stabilisation des pores formés par le MSPC au niveau de la bicouche (Needham *et al.*, 2013). Il fournit une barrière stérique et une force répulsive qui stabilisent les nanopores et les laissent ouverts. En outre, l'effet du DSPE-PEG₂₀₀₀ dépend de sa concentration : d'une part une concentration molaire minimale de 1,3% est requise pour assurer une libération ultrarapide à partir des LTSL, et d'autre part cette concentration est suffisante pour obtenir le même résultat de libération qu'à 3,8 mol% (Needham *et al.*, 2013). Dans le cas des LTSL, les travaux de Needham *et al.* (Needham *et al.*, 2013) sur la libération de la doxorubicine d'une formulation de DPPC/MSPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ ont montré que le DSPE-PEG₂₀₀₀ est indispensable pour une libération massive et rapide de la doxorubicine. Cependant, 1,3 mol% de DSPE-PEG₂₀₀₀ suffisent pour obtenir une libération rapide, et aucun effet supplémentaire n'est observé à plus forte concentration (Banno *et al.*, 2010; Needham *et al.*, 2013). D'autre part, les essais de libération réalisés *in vitro* avec le ThermoDox[®] renfermant 3,8 mol% DSPE-PEG₂₀₀₀ (Celsion, 2014), montrent une bonne stabilité en dessous de 37°C avec moins de 10% de doxorubicine libérée, contre 50% à 42°C en 20 secondes. Le ThermoDox[®] relargue également environ 25 fois plus de doxorubicine après une heure de chauffage à 42°C *in vivo*, comparé à la libération à 34°C.

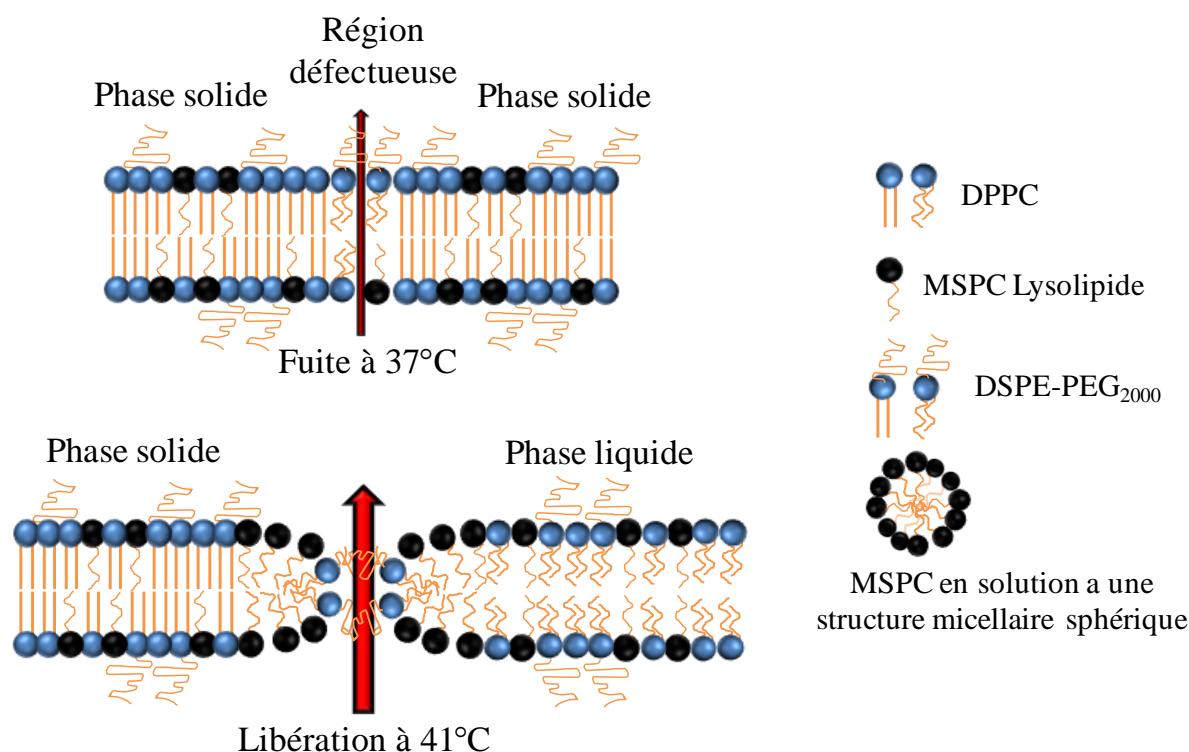


Figure 11. Schéma de la structure postulée des défauts membranaires qui se traduisent par des fuites à 37°C à travers une bicouche de DPPC ou de DPPC/MSPC en présence du DSPE-PEG en phase solide en l'absence de nanopores (haut), et de la perméabilité accrue d'une bicouche de DPPC/MSPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ dans la région de transition de phase à travers les pores de MSPC stabilisés par le DSPE-PEG₂₀₀₀ (bas).

2. Le deuxième mécanisme proposé est basé sur la capacité des lysolipides à se dissocier de la bicouche au moment de la transition de phase et à engendrer ainsi des « zones défectueuses » au niveau de la bicouche qui aboutissent également à la formation de structures et d'agréats (de type non liposomal) ce qui augmente par la suite la perméabilité des liposomes.

Les lysolipides augmentent donc la perméabilité de la bicouche des LTSL et permettent une libération ultrarapide et massive de leur contenu à la T_m . En raison de leur structure monocaténaire, ils induisent une légère diminution de la T_m sans élargissement du pic endothermique de transition de phase et ce à une concentration comprise entre 5 et 18 mol% en MSPC (Needham *et al.*, 2013). Cependant, au-delà de 18 mol% le MSPC réduit la stabilité de la phase gel et diminue ainsi la capacité d'encapsulation des liposomes.

5.4. Intérêt des liposomes thermosensibles contenant un lysolipide versus les liposomes thermosensibles traditionnels

L'intérêt de la libération ultrarapide à partir des LTSL provient du fait que le temps de passage des liposomes circulants au niveau de la tumeur est court. La vitesse de libération du PA doit être plus rapide que le temps de transit du liposome à travers la région chauffée de la

tumeur. Avec une vitesse dans le sang d'environ 0,4 mm/s, le temps de transit de liposomes à travers, par exemple, 2 cm de capillaires serait de 50 s, ce qui est temporellement favorable pour avoir un PA biodisponible (Needham *et al.*, 2013). On note que récemment des LTS à base de Brij78 (un tensioactif non ionique lipide monocaténaire PEGylé) qui remplace à la fois les lysolipides et le DSPE-PEG₂₀₀₀ des LTSL ont été développés par Tagami *et al.* (Tagami *et al.*, 2011). Ces vésicules se caractérisent par une stabilité identique à celle des LTSL à 37°C et une libération plus importante à 40-41°C.

Tableau 5. Tableau récapitulatif comparatif des deux catégories de LTS.

Type de LTS	<i>LTST</i>	<i>LTSL</i>
Mécanisme de libération à travers la bicouche	Régions de transition de phase (Yatvin <i>et al.</i> , 1978)	Nanopores toroïdaux (Needham <i>et al.</i> , 2013)
Composition générale	-DPPC \pm HSPC ou DSPC - \pm CHOL -DSPE-PEG ₂₀₀₀ (Al-Jamal <i>et al.</i> , 2012)	-DPPC -Lysolipide (MSPC/MPPC) -DSPE-PEG ₂₀₀₀ (Tagami <i>et al.</i> , 2011; Needham <i>et al.</i> , 2013)
Caractéristiques de la transition de phase	Perméabilité thermique à la T_m (42 à 45°C) (Al-Jamal <i>et al.</i> , 2012)	-Perméabilité thermique commence à $T_m - 2^\circ\text{C}$ (Al-Jamal <i>et al.</i> , 2012) (Needham <i>et al.</i> , 2013) avec un maximum à la T_m -Perméabilité thermique à 41-42°C (Al-Jamal <i>et al.</i> , 2012; Needham <i>et al.</i> , 2013)
Cinétique de libération	-Libération intermédiaire (Al-Jamal <i>et al.</i> , 2012) -Duré moyenne de libération : 30 min	-Profil de libération dépend du lysolipide (Needham <i>et al.</i> , 2013) -Libération « burst » (> 90% en 5 min) <i>in vitro</i> (Mills and Needham, 2005)
Avantages	-Libération du PA dans la MEC tumorale -Stabilité <i>in vivo</i> à 37°C (Al-Jamal <i>et al.</i> , 2012) -Accumulation tumorale sans/avec HT (Al-Jamal <i>et al.</i> , 2012)	-Libération ultrarapide et complète à 42°C en 5 min (Mills and Needham, 2005) -Libération ultrarapide non compromise par la perte de lysolipides à 37°C (Needham <i>et al.</i> , 2013) -2,5 mol% de MSPC est suffisant (Needham <i>et al.</i> , 2013)
Limites	Cinétique de libération lente (Yatvin <i>et al.</i> , 1978; Gaber <i>et al.</i> , 1995; Mills and Needham, 2005)	-Libération du PA dans les microvaisseaux tumoraux -Instabilité <i>in vivo</i> à 37°C : désorption des lysolipides (70%) à 37°C en 1 h (Banno <i>et al.</i> , 2010) -Fuite significative du PA (10-20% en 30 min à 10% MSPC) (Tagami <i>et al.</i> , 2011) -9,6 mol% MSPC : diminution de l'AUC et de la demi-vie -Toxicité lysolipides (Fuly <i>et al.</i> , 2003)

6. Libération active à partir de liposomes thermosensibles

En partant du principe qu'un PA n'est actif que lorsqu'il est biodisponible i.e. libéré de son vecteur, plusieurs stratégies ont été conçues en vue d'améliorer la libération *in situ* du PA et d'augmenter la quantité biodisponible à partir des liposomes. Ces stratégies s'appuient sur la conception de liposomes qui répondent à des stimuli locaux en libérant leur contenu soit dans les microvaisseaux tumoraux, soit après leur extravasation dans la MEC, soit encore suite à leur pénétration cellulaire. Les stimuli qui déclenchent une libération active du PA encapsulé peuvent être classés en deux catégories : les stimuli externes (Viroonchatapan *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2011; de Smet *et al.*, 2011; Tagami *et al.*, 2011; Al-Jamal *et al.*, 2012; Schroeder *et al.*, 2012; Escoffre *et al.*, 2013; Kheirrolomoom *et al.*, 2013; Needham *et al.*, 2013) et les stimuli internes (Helmlinger *et al.*, 1997; Ong *et al.*, 2008; Banerjee *et al.*, 2009). Dans la présente revue de la littérature nous nous limitons uniquement à l'HT comme stimulus externe de la libération.

6.1. Méthodes d'induction de l'hyperthermie

L'HT déclenchant la libération active à distance à partir des LTS peut être générée par différents moyens présentant chacun des avantages et des inconvénients comme le résume le tableau 6.

1. L'HT fournie par un bain-marie thermostaté, des fréquences radio ou de l'énergie micro-ondes : Ces sources peuvent générer une HT locale allant jusqu'à 50°C. Bien que les fréquences radio et l'énergie micro-ondes soient applicables en clinique, le bain-marie thermostaté se limite à l'expérimentation animale en préclinique. Il impose l'isolement de l'organe porteur de la tumeur ainsi que le contrôle précis de la température de la tumeur tout au long de l'expérimentation (Tagami *et al.*, 2011; Al-Jamal *et al.*, 2012). Par conséquent, comme un organe de la souris est exposé à l'HT et non pas uniquement la tumeur, la souris réagit par rétrocontrôle négatif afin d'abaisser la température corporelle. L'utilisation d'un bain-marie en préclinique nécessite un contrôle continu de la température physiologique corporelle de l'animal. L'autre inconvénient de ces sources est que l'HT fournie se limite aux tumeurs primaires et que les micro-métastases et les tumeurs disséminées ne sont toutefois pas accessibles (Allen and Cullis, 2013).
2. L'HT induite par un champ magnétique alternatif (CMA) ou oscillant : un CMA (50–100 kHz) est capable de générer une HT sélective ou locale. Le déclenchement de la libération du PA en réponse à l'HT induite par CMA nécessite l'utilisation de liposomes

sensibles au champ magnétique ou magnétoliposomes (Viroonchatapan *et al.*, 1997). La libération peut ainsi être modulée par la durée du CMA et la libération de PA peut être de type pulsatile ou « à la demande ». En outre, un CMA est capable d'altérer la structure des liposomes en augmentant la porosité de la bicouche (Bringas *et al.*, 2012) favorisant ainsi la libération de leur contenu. En conséquence de la perte d'hystérèse et/ou de la relaxation de Néel sous l'effet du CMA, les magnétoliposomes se comportent comme des transducteurs qui génèrent de la chaleur dans le microenvironnement de la tumeur. Un autre avantage à l'utilisation d'un CMA réside dans la possibilité de le combiner à un champ magnétique permanent qui lui permet de favoriser l'accumulation de magnétoliposomes dans la tumeur cible. La possibilité de réaliser de l'imagerie par résonance magnétique permet de suivre, en temps réel, la circulation et l'accumulation des magnétoliposomes et d'obtenir ainsi une méthode d'imagerie couplée à la thérapie, que l'on appelle aujourd'hui la théranostique. Néanmoins, la complexité du dispositif extracorporel fournissant le champ magnétique permanent concentré sur la tumeur cible constitue le principal désavantage. Cependant, en cas de cancers non opérables en raison de risque d'hémorragie ou de la localisation de la tumeur, comme le cancer du cerveau, les magnétoliposomes représentent une alternative intéressante. Enfin, l'HT et le guidage des magnétoliposomes sont limités aux nodules tumoraux accessibles.

3. L'HT induite par les ultrasons (US) : les ultrasons de basses fréquences (quelques MHz) sont capables de générer une HT locale déclenchant une libération contrôlée spatio-temporelle du PA à partir de LTS prévenant ainsi les effets indésirables au niveau des tissus sains. L'utilisation des US est séduisante parce qu'ils sont efficaces sans être invasifs, ne génèrent pas de radiations ionisantes nocives, en plus d'une facilité à contrôler la profondeur de la pénétration tissulaire des ondes par modulation de leur fréquence, la longueur des pulsations et de la durée d'exposition. Contrairement à l'utilisation du bain-marie, les US n'augmentent pas la température corporelle globale ce qui évite des mesures supplémentaires afin de maintenir une température physiologique stable. En addition à l'effet thermique, les US sont capables d'augmenter la libération des PA par effet mécanique lié au phénomène de cavitation inertielle (Novell *et al.*, 2012). Ce même phénomène de cavitation induit une augmentation locale et transitoire de la perméabilité vasculaire ce qui favorise l'extravasation des LTS (Kheirloom *et al.*, 2010). L'utilisation des US focalisés de haute intensité (HIFU) induit une HT modérée qui déclenche la libération de PA à partir de LTS (ThermoDox® et HIFU). En outre, les US engendrent des pores membranaires qui favorisent la

pénétration des LTS dans les cellules tumorales et la libération du PA dans le cytosol surmontant ainsi la dégradation qui peut être observée lors de l'endocytose. Les microbulles de gaz constituent des agents de contraste ultrasonores qui permettent le suivi en temps réel de l'acheminement des LTS. La combinaison des US de basses fréquences, des microbulles de gaz et des US de hautes fréquences (> 20 MHz) permet de coupler l'imagerie ultrasonore de haute qualité à la thérapie (théranostique). Néanmoins, la complexité de conception d'une sonde bimodale constitue un challenge. Par ailleurs, l'augmentation de la perméabilité vasculaire par le phénomène de cavitation favorise la dissémination métastatique. Enfin, l'HT induite par les US est limitée aux tumeurs accessibles.

4. L'HT induite par la lumière (photons) : L'illumination à des longueurs d'ondes spécifiques i.e. l'ultraviolet (UV), le visible ou le proche infrarouge (PIR) représente une option non-invasive pour déclencher de façon contrôlée la libération de PA à partir de nanovecteurs via le phénomène de photosensibilité (Agarwal *et al.*, 2011). La photosensibilité sélective de matériaux spécifiques ajoutés à la composition de nanoparticules polymères a suscité de nombreuses études. Elle a ainsi permis une modulation « à la demande » de la libération de PA encapsulés en alternant les longueurs d'onde et (Schroeder *et al.*, 2012). L'inconvénient majeur de ces systèmes consiste en la faible pénétration (10 mm) de la lumière UV-visible (i.e. < 700 nm) due à la diffusion au niveau des tissus mous. Cependant, les matériaux sensibles au PIR (700-1 000 nm) constituent une alternative plus prometteuse en clinique du fait d'une meilleure pénétration tissulaire grâce à une atténuation minimale par les tissus. La transmission du PIR dans les tissus mous peut être réalisée à des profondeurs allant jusqu'à 10 cm. L'utilisation de matériaux plasmoniques comme l'or qui absorbent dans le PIR et qui sont capables de convertir l'énergie photonique en chaleur permet de déclencher la libération de PA anticancéreux encapsulés dans des LTS associés à des nanoparticules d'or (Agarwal *et al.*, 2011). Cette combinaison a montré un effet anticancéreux significatif sur des modèles de cancer du sein (Lee *et al.*, 2011) ou de gliome (Agarwal *et al.*, 2011) en préclinique. Bien que le concept de l'association de LTS à des nanoparticules d'or pour induire une libération locale de leur contenu soit prometteur, ceci impose l'utilisation de matériaux spéciaux sensibles à la lumière, par exemple l'or, dont l'innocuité reste à prouver.

Au final, l'avenir est prometteur pour l'association de LTS à l'HT. Plusieurs sources génératrices d'HT semblent être efficaces. Cependant, l'utilisation de matériaux non toxiques

reste un point critique dans la transposition clinique de ces systèmes. L'association LTS et US de basses fréquences ou HIFU semble avoir conjointement les avantages d'une libération active et d'une sécurité d'utilisation. L'association de deux sources différentes est possible surtout dans un but théranostique afin de joindre les avantages de chacune des méthodes (Grüll and Langereis, 2012).

Tableau 6. Tableau récapitulatif des différentes sources d'HT.

Source d'HT	<i>Fréquences radio, micro-ondes, bain-marie</i>	<i>Champs magnétique alternatif</i>	<i>Ultrasons</i>	<i>Lumière (PIR)</i>
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> -HT locale (50°C) -Libération active locale -Application en clinique (excepté bain-marie) 	<ul style="list-style-type: none"> -HT locale -Libération active locale -Libération pulsatile -↑ porosité de la bicouche -Génération de chaleur locale -Guidage -Théranostique 	<ul style="list-style-type: none"> -HT au point focal -Libération active spatiotemporelle -Non invasifs -Non ionisants -Pénétration tissulaire contrôlable -↑ libération (cavitation) -↑ extravasation -Libération cytosolique -Théranostique 	<ul style="list-style-type: none"> -HT locale -Libération active locale
Limites	<ul style="list-style-type: none"> -Limitation aux tumeurs primaires -Métastases inaccessibles 	<ul style="list-style-type: none"> -Complexité : magnéto liposomes, dispositif de guidage et d'HT -Limitation aux tumeurs accessibles 	<ul style="list-style-type: none"> -Complexité : sonde bimodale -↑ risque dissémination métastatique -Limitation aux tumeurs accessibles (atténuation tissulaire) 	<ul style="list-style-type: none"> -Association LTS et nanoparticules d'or -Utilisation de matériaux photosensibles : toxicité

6.2. Effet direct de l'hyperthermie

L'utilisation de l'HT dans le traitement du cancer conjointement à la chimiothérapie remonte au travail de Coley (Coley, 1911; Zacharski and Sukhatme, 2005). Ces travaux, ainsi que toute une série d'études qui ont suivi, ont montré une synergie d'action entre une HT appliquée localement et l'activité pharmacologique des PA anticancéreux aboutissant à une efficacité thérapeutique accrue. Cet effet a été démontré pour plusieurs PA dont le cyclophosphamide, le cisplatine, la doxorubicine et la gemcitabine (Hahn *et al.*, 1975). En effet, l'HT possède de nombreux effets biologiques qui agissent en synergie avec l'effet cytotoxique des PA, notamment un effet direct sur les cellules cancéreuses, un renforcement de l'immunité locale antitumorale et une amélioration de l'efficacité de la chimiothérapie anticancéreuse par vasodilatation.

L'effet cytotoxique direct et le renforcement de l'immunité antitumorale sont des effets locaux médiés par l'HT, essentiellement par la sécrétion des protéines de choc thermique qui induisent une cytotoxicité médiée par les lymphocytes T contre les cellules cancéreuses, à laquelle s'ajoute un effet apoptotique direct. Cependant, l'effet vasculaire de l'HT est régi par la thermorégulation qui entraîne, à la suite d'une élévation de température, une vasodilatation et augmente ainsi l'effet anticancéreux des PA. Des études ont récemment montré que l'HT utilisée conjointement à la chimiothérapie intravésicale améliore l'efficacité thérapeutique dans le cas du cancer de la vessie non invasif (van der Heijden *et al.*, 2005; Owusu *et al.*, 2013).

Combinée avec les LTS, l'HT appliquée localement au site de la tumeur a un double rôle. Elle favorise l'extravasation des LTS dans la MEC grâce à des microvaisseaux dilatés et un flux sanguin augmenté dans la zone de la tumeur. L'HT provoque aussi un rétrécissement de l'endothélium, ce qui génère de plus grandes fenestrations dans les microvaisseaux sanguins tumoraux qui persistent pendant 6 h post-traitement HT (Kong *et al.*, 2001). Dans ce contexte, deux cas de combinaison thérapeutique de LTS et de l'HT se présentent :

1. Lorsque la température appliquée ne dépasse pas 42°C pendant une durée de 30 à 60 min, aucune cytotoxicité directe induite par l'HT n'est observée. Néanmoins les avantages de la stimulation de l'immunité anti-tumorale, l'extravasation accrue et le déclenchement de la libération active sont mis à profit.
2. Lorsque la température appliquée excède 42°C pendant une durée de 30 à 60 min, une mort cellulaire exponentielle et irréversible induite directement par l'HT est observée en plus des autres effets cités ci-dessus. Effectivement, la synergie entre l'ablation thermique et la cytotoxicité des PA anticancéreux encapsulés dans les LTS a été récemment décrite (Ahmed *et al.*, 2012) et plusieurs formulations ont progressé vers des essais cliniques (Vujaskovic *et al.*, 2010).

6.3. Activation de la libération d'agents anticancéreux par l'hyperthermie

L'efficacité de l'application d'une HT locale sur la libération de PA a été démontré en 1979 au cours d'une expérience de libération du méthotrexate liposomal dans des tumeurs chauffées qui a entraîné une concentration en PA quatre fois plus élevée que dans les tumeurs témoins non chauffées (Weinstein *et al.*, 1979). Dans deux expériences séparées, un dispositif à micro-ondes ou un appareil à ultrasons ont été utilisés pour appliquer une HT à des liposomes PEGylés chargés en doxorubicine dans deux modèles de tumeurs solides murins différents. Dans les deux cas, il a été observé une élévation des concentrations de doxorubicine dans la tumeur et une augmentation de l'efficacité antitumorale (Huang *et al.*, 1994; Ning *et al.*, 1994). A ce jour, l'application la plus avancée de libération activée est le ThermoDox[®] (Celsion corporation).

Thermodox[®] est actuellement en essais cliniques de phase III (étude HEAT) chez des patients atteints de carcinome hépatocellulaire en association avec l'ablation par radiofréquence et en phase II dans le cancer récurrent de la paroi thoracique du sein et des métastases hépatiques du cancer colorectal (Celsion, 2014). Le ThermoDox[®] est constitué d'une formulation de LTSL PEGylés à base d'un mélange de DPPC/MSPC/DSPE-PEG₂₀₀₀, dans un rapport de 86,5/9,7/3,8% et encapsulant la doxorubicine (Needham *et al.*, 2013). Ces liposomes sont activables à une température avoisinant les 42°C. ThermoDox[®], délivrée par perfusion IV, est conçue pour une utilisation en combinaison avec des traitements à base d'HT, tels que l'ablation thermique par radiofréquence, l'HT générée par des micro-ondes et les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU). ThermoDox[®] s'appuie sur la biologie des tumeurs pour délivrer des concentrations plus élevées de doxorubicine directement au site de la tumeur cible. Le traitement se base sur l'effet EPR et son amplification par l'HT générée par la radiofréquence appliquée localement (vasodilatation tumorale). Il en découle une extravasation et une accumulation plus importantes des liposomes dans la tumeur avant de relarguer la doxorubicine encapsulée. Le potentiel de cette approche a été démontré *in vivo*, où la concentration de doxorubicine dans la tumeur relarguée à partir de ThermoDox[®], après une heure de chauffage à 42°C, est 5 fois plus élevée que celle libérée à partir des LNTS encapsulant la doxorubicine et 25 fois plus élevée que celle accumulée à partir de la solution de doxorubicine injectée par voie IV (Needham *et al.*, 2000; Al-Jamal *et al.*, 2012; Celsion, 2014).

6.4. Limites de l'hyperthermie

1. La contrainte majeure à l'utilisation de l'HT dans la thérapie du cancer est d'une part la difficulté d'obtenir une HT complète au niveau du tissu cible et, d'autre part, de surveiller la température tissulaire. En effet la tache focale des ultrasons par exemple est souvent petite par rapport à la dimension d'une tumeur. Par ailleurs, l'élévation de température peut générer une toxicité vis-à-vis des tissus sains adjacents. Le développement récent de dispositifs générateurs d'HT plus sophistiqués a permis aux chercheurs de mieux diriger et concentrer l'énergie nécessaire pour produire de l'HT localement au niveau du tissu cible, de mieux suivre la température tissulaire tout au long du traitement et de minimiser ainsi la toxicité à l'égard des tissus sains.
2. Un point substantiel qu'il faudrait garder à l'esprit est que les patients décèdent rarement des tumeurs primaires et que ces dernières subissent une résection chirurgicale le plus souvent ou une ablation par rayonnement. Cependant, la maladie métastatique est une cause fréquente de décès dans le cancer avancé. Or, l'efficacité d'une HT locale se limite à une distance bien définie qui dépend de la source génératrice de l'HT et les petites

tumeurs métastatiques ne sont souvent pas accessibles par l'HT en raison de l'atténuation de la température aux sites les plus profonds. D'où l'intérêt de choisir une source d'HT adaptée au site pathologique cible. Cependant, une combinaison de l'HT avec les LTS pourrait combler le déficit de l'HT à atteindre les micro-métastases. En effet, le concept de l'approche ThermoDox[®] est d'optimiser l'efficacité thérapeutique de l'ablation par radio-fréquence en la combinant aux LTSL encapsulant la doxorubicine. Le rôle des liposomes de ThermoDox[®] est de cibler les zones tumorales non détruites lors de l'ablation. L'atteinte des micro-métastases qui sont le plus souvent responsables de la récurrence du cancer après le traitement permet alors d'améliorer l'efficacité du traitement et la survie des patients.

3. Une étude récente a montré que l'exposition des cellules du cancer du colon (HCT116) à une HT de 42°C pendant 30 min peut induire une amplification génique dans les cellules cancéreuses, probablement par génération de cassures double brin d'ADN, qui sont censées être nécessaires pour l'initiation d'une amplification génique. Ce processus peut être favorisé par l'HT suite à la dénaturation des protéines cellulaires responsables de points de contrôle, la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN et des fonctions des télomères (Yan *et al.*, 2012).

7. 5-Fluorouracile

7.1. Mécanisme d'action du 5-Fluorouracile

Le 5-Fluorouracile (5-FU) est une fluoropyrimidine (5-Fluoro-1,3-diazine) de la famille des pyrimidines qui sont des molécules azotées hétérocycliques aromatiques qui constituent les bases azotées retrouvées dans les molécules d'ADN (thymine, cytosine) et d'ARN (uracile, cytosine) (Figure 12).

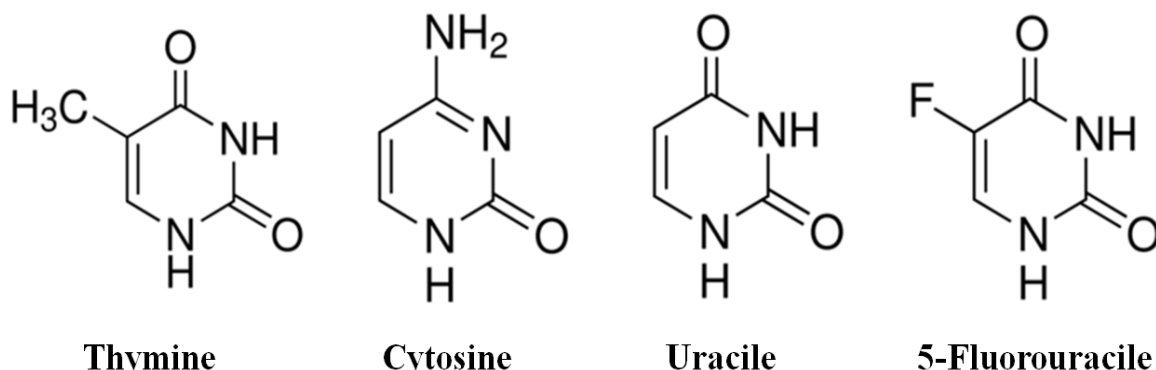
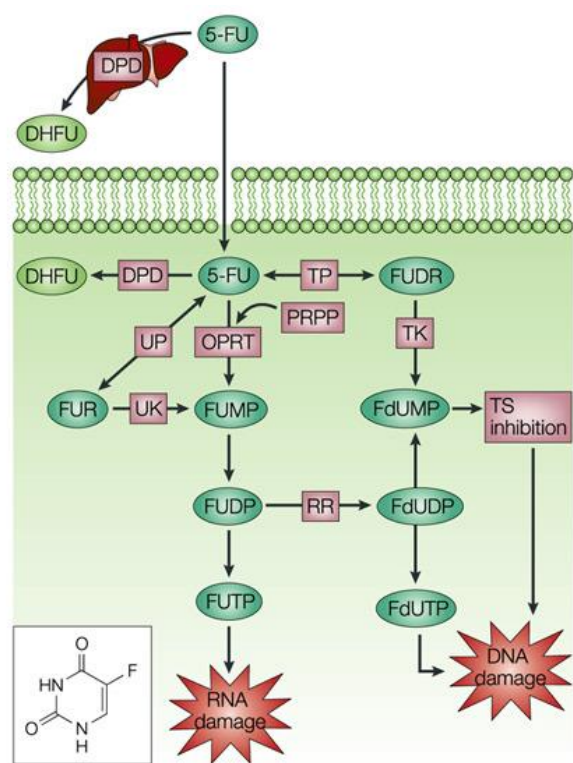


Figure 12. Structures chimiques des pyrimidines.

Le 5-FU appartient à la classe des médicaments anti-métabolites, sous-classe des analogues de la pyrimidine. Le 5-FU est une prodrogue inactive par elle-même, les métabolites issus de l'anabolisme cellulaire du 5-FU sont cytotoxiques. Après administration IV, le 5-FU pénètre rapidement dans les cellules à travers un mécanisme de transport actif saturable (Wohlhueter *et al.*, 1980) où il sera converti par les mêmes réactions enzymatiques que les pyrimidines naturelles en trois principaux métabolites actifs : le fluorodéoxyuridine monophosphate (FdUMP), le fluorodéoxyuridine triphosphate (FdUTP) et le fluorouridine triphosphate (FUTP). Ces déoxyribonucléotides et ribonucléotides cytotoxiques sont incorporés dans l'ADN et l'ARN, induisant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Son mécanisme d'action est basé sur l'interférence des métabolites phosphorylés au niveau de la biosynthèse des acides nucléiques à trois niveaux (Longley *et al.*, 2003) (Figure 13) :

1. Il est incorporé dans l'ARN sous forme de FUTP, provoquant des altérations dans la transformation et la fonction de l'ARN.
2. Il se lie à la thymidylate-synthétase (TS), seule enzyme qui permet la biosynthèse de la thymine, sous forme d'un complexe ternaire FdUMP-TS-Tétrahydrofolate et bloque la méthylation de l'uracile en thymine indispensable à la réplication de l'ADN. L'inhibition de la synthèse de thymine inhibe en conséquence la synthèse d'ADN dans les cellules en phase S du cycle cellulaire.
3. Il s'incorpore dans l'ADN sous forme de FdUTP engendrant des dommages de l'ADN résultant.

Tous ces mécanismes entraînent l'activation de la p53, facteur de transcription responsable de la régulation de certaines fonctions cellulaires importantes telles que la mitose ou l'apoptose, il en résulte une apoptose p53-dépendante. On retrouve également du 5-FU dans l'ADN cellulaire, sans que l'on sache si cette localisation contribue à sa cytotoxicité.



Nature Reviews | Cancer

Figure 13. Anabolisme, catabolisme et mécanisme d'action du 5-FU. Adaptée de Longley *et al.* 2003 (Longley *et al.*, 2003).

La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) est l'étape enzymatique limitante dans le catabolisme des pyrimidines naturelles mais également du 5-FU. Elle présente une activité élevée dans les cellules hépatiques et les cellules sanguines mononucléaires, et son activité est également largement distribuée dans une variété d'organes (muqueuse intestinale, pancréas, poumons, reins). Il a été démontré que 80% à 85% du 5-FU sont catabolisés en métabolites inactifs par la DPD hépatique, et que de 1 à 3% de la dose initiale de 5-FU entraînent les effets cytotoxiques sur les cellules tumorales et les tissus normaux (Diasio and Harris, 1989).

7.2. Principales indications du 5-FU

Développé par Heidelberger *et al.* en 1957 (Heidelberger *et al.*, 1957), le 5-FU a été introduit dans l'arsenal des médicaments anticancéreux, il y a plus de 50 ans aujourd'hui. Il est devenu un médicament clé prescrit dans le traitement de différents types de cancers grâce à son large spectre d'activité anti-tumorale, ainsi qu'à sa synergie d'action avec d'autres médicaments :

- Les adénocarcinomes digestifs : essentiellement le cancer colorectal (El-Khoueiry and Lenz, 2006; Wilson *et al.*, 2010) en traitement adjuvant (après résection) ou en état métastatique. Le 5-FU constitue le PA central dans le protocole FOLFIRI (en association

avec l'inhibiteur de la topo-isomérase, l'Irinotécan, et l'acide folinique qui renforce la sensibilité de la TS à l'action du 5-FU), et dans le protocole FOLFOX (en association avec l'Oxaliplatine et l'acide folinique). Ces chimiothérapies combinées ont entraîné une amélioration de 50% des taux de réponse ainsi qu'une amélioration de la survie globale (Douillard *et al.*, 2000; Giacchetti *et al.*, 2000). Le 5-FU est également indiqué dans le traitement du cancer pancréatique.

- L'adénocarcinome mammaire : en traitement adjuvant ou lors des rechutes. Le 5-FU rentre dans la composition des protocoles FAC (5-FU + Adriamycine + Cyclophosphamide) ou FEC (5-FU + Epirubicine + Cyclophosphamide).
- Les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures et de l'œsophage, en association avec le Cisplatine (et éventuellement la radiothérapie).
- Le traitement du cancer de l'ovaire, du foie et du cerveau.

Dans ces traitements, le 5-FU est administré sous forme d'infusion IV continue démontrée plus efficace qu'une injection en bolus car le 5-FU s'est avéré un anti-métabolite dont l'activité est temps-dépendante (Skipper *et al.*, 1964). Cependant, des études cliniques récentes (Lembersky *et al.*, 2006) ont montré que, dans certains protocoles, la perfusion IV continue du 5-FU peut être substituée par des formes dédiées à la voie orale sans toutefois modifier l'efficacité ou les effets indésirables du traitement.

7.3. Principales toxicités du 5-FU

Outre les toxicités générales de la chimiothérapie qui attaquent les cellules saines à multiplication rapide, telles que les cellules de la peau, des cheveux, de la muqueuse de la bouche et de la moelle osseuse, le 5-FU est spécifiquement responsable de certaines toxicités sévères :

1. Toxicité gastrique (stomatite, oesophagopharyngite, diarrhée, anorexie, perte de poids et ulcération gastro-intestinale) et hématologique (neutropénie, thrombocytopénie) dues essentiellement à sa conversion en FdUMP et son incorporation dans l'ADN des cellules de l'estomac, du duodénum, de l'iléon, du côlon et du rectum dans le tractus gastro-intestinal (Houghton *et al.*, 1979) et de la moelle osseuse (Schuetz *et al.*, 1984). La perfusion continue du 5-FU limite ces toxicités.
2. Toxicité neurologique (Okeda *et al.*, 1990) et cardiaque (Matsubara *et al.*, 1980) : troubles de l'ECG voire une insuffisance cardiaque ou un infarctus aigu du myocarde, liée essentiellement à son catabolite α -Fluoro- β -alanine (FBAL).

3. Troubles cutanés ou « syndrome main-pied » liés également au catabolite FBAL. Il s'agit d'une érythrodermie suivie d'une desquamation au niveau de la paume des mains ou de la plante des pieds. Un traitement par une pommade apaisante est souvent nécessaire.

7.4. Intérêt de l'encapsulation du 5-FU dans des vecteurs colloïdaux

Les PA cytotoxiques, généralement, et le 5-FU particulièrement présentent une forte relation réponse-dose et nécessitent de fortes doses pour assurer le succès thérapeutique (Hryniuk *et al.*, 1987). Néanmoins, le problème commun aux PA anticancéreux est la faible spécificité vis-à-vis des cellules cancéreuses, la toxicité élevée et la sensibilité à induire une résistance cellulaire aux PA. Ceci conduit à un dilemme difficile pour les cliniciens à choisir entre de fortes doses de PA avec un risque élevé de toxicité pour les tissus normaux, ou de faibles doses de PA avec de faibles probabilités de thérapeutique. En outre, malgré les progrès dans la compréhension des facteurs moléculaires qui contribuent à la cytotoxicité du 5-FU, 50% des patients atteints du cancer colorectal métastatique ne répondent pas à la chimiothérapie à base de 5-FU. Le 5-FU se caractérise par une demi-vie plasmatique courte estimée entre 10 et 15 min après administration par voie IV bolus, une clairance à partir de plasma au bout d'1 h suite à un métabolisme très rapide par l'enzyme DPD ou l'uracile réductase (Chadwick and Rogers, 1972; MacMillan *et al.*, 1978 451; Heggie *et al.*, 1987). La résistance des cellules tumorales au traitement par le 5-FU pose un problème sérieux. Les causes de la résistance peuvent être multiples. Il est décrit qu'une surexpression du gène codant pour la TS (Inoue *et al.*, 2005) ou une surexpression des enzymes impliquées dans l'anabolisme du 5-FU, orotate phosphoribosyl transférase (OPRT), uridine kinase (UK) ou ribonucléotide réductase (RR) (Figure 13), dans les cellules tumorales est associée à la résistance au 5-FU. La DPD dans la tumeur et dans le foie est fortement liée à la résistance au 5-FU (Li *et al.*, 2013). Cette résistance est souvent acquise suite à un traitement à long terme à base du 5-FU surtout en cas du traitement de maintenance à long terme du cancer colorectal métastatique sans mentionner les résistances dues aux facteurs métaboliques et endocriniens comme l'hyperglycémie (Ma *et al.*, 2014).

En raison des problèmes de toxicité et de résistance au 5-FU, de nouvelles stratégies doivent être développées. L'approche la plus réussie à ce jour a été le développement d'une pro-drogue où la molécule mère (capécitabine) est convertie par voie enzymatique en 5-FU dans les tissus cibles. Vu la variabilité interindividuelle et la dépendance de la conversion enzymatique du taux de DPD, cette pro-drogue n'a pas produit les espoirs attendus (Miura *et al.*, 2010). Cependant, une voie très rationnelle et prometteuse de la recherche consiste en l'amélioration de la pharmacocinétique (demi-vie, biodisponibilité, distribution, ciblage) du 5-FU notamment par

des modifications galéniques. La vectorisation du 5-FU le protège du catabolisme par la DPD, elle permet de bénéficier de l'effet EPR au niveau des tissus tumoraux ce qui maximise la quantité de PA qui peut atteindre les sites tumoraux ciblés et réduit sa toxicité systémique.

7.5. Vectorisation du 5-FU par les liposomes

L'encapsulation du 5-FU requiert de bien connaître ses propriétés physicochimiques. En effet, le 5-FU est une molécule hétérocyclique non ionisée à pH neutre, hydrophile ($\log P_{\text{oct/eau}} = -0,824$), de faible MM (130,08 g/mol), soluble dans l'eau (12,2 mg/ml à 20°C) et dont la température de fusion est comprise entre 282 et 286°C. Plusieurs vecteurs à base de 5-FU destinés à la voie IV ont été développés. Dans cette revue, nous nous intéressons uniquement aux travaux concernant les liposomes :

Les premiers liposomes conçus à base de 5-FU ont montré une faible efficacité d'encapsulation (EE = Quantité de 5-FU encapsulée par rapport à la quantité totale de départ) ne dépassant pas 25% (Glavas-Dodov *et al.*, 2005). Une faible capacité de rétention du 5-FU encapsulé a aussi été observée. Etant une molécule hydrophile, l'EE du 5-FU est fortement corrélée au volume aqueux encapsulé dans les liposomes, alors que capacité de rétention est essentiellement reliée au coefficient de partage $\log P_{\text{oct/eau}}$ du 5-FU : plus le $\log P$ est faible plus la libération est lente (Tsukada *et al.*, 1984). Cela explique la meilleure encapsulation du 5-FU dans des LUV (9%) que dans des MLV (2%) et sa meilleure rétention à l'intérieur des MLV (15% libérés en 4 h dans du PBS à pH 7,4 à la température ambiante) par rapport aux LUV (35%) vu la présence de plus d'une bicouche lipidique (Fresta *et al.*, 1993). Le 5-FU n'interagit pas (Ozer and Talsma, 1989; Fresta *et al.*, 1993; Kaiser *et al.*, 2003) ou peu avec la bicouche lipidique (El Maghraby *et al.*, 2005). Cependant la bicouche lipidique est très perméable au 5-FU. Comme nous l'avons vu précédemment, la perméabilité de la bicouche qui détermine la rétention du PA encapsulé, est régie par sa composition. L'insertion du CHOL et/ou l'utilisation de phospholipides saturés ayant une longue chaîne acyle doivent favoriser la rétention du PA. En outre, la rétention du 5-FU dans la cavité aqueuse est directement liée à sa capacité à former des liaisons de type hydrogène avec la bicouche (Ozer and Talsma, 1989). Les formulations classiques de liposomes à base de 5-FU ont été conçues sans fournir aucune amélioration substantielle de l'activité thérapeutique par rapport à une dose optimale de 5-FU non encapsulée probablement en raison de la fuite rapide du 5-FU à l'extérieur du liposome suite à l'administration de liposomes (Ozer and Talsma, 1989; Fresta *et al.*, 1993; Kaiser *et al.*, 2003). Plusieurs stratégies ont été testées en vue d'optimiser l'EE ainsi que la rétention du 5-FU dans le cœur aqueux des liposomes. Sachant que ces deux paramètres sont souvent interdépendants.

La lyophilisation de liposomes en présence de cryoprotecteur favorise une conservation à long terme des liposomes. En dépit d'une fuite de 20% du 5-FU encapsulé à l'étape de congélation (Glavas-Dodov *et al.*, 2005) et d'une cinétique de libération biphasique à la réhydratation, on observe une première phase de libération rapide de type « burst » du PA qui se dissocie des liposomes pendant l'étape de congélation et s'adsorbe à la surface de liposomes suivie d'une deuxième phase de libération lente. La libération « burst » constitue une forte limite dans le cas de liposomes destinés au traitement du cancer par voie IV puisque ceci favorise une libération précoce du 5-FU dans le sang.

Un moyen pour éviter la fuite de 5-FU par diffusion de Fick consiste à préparer des gels de phospholipides vésiculaires (en anglais « vesicular phospholipid gel, VPG»). Les VPG sont des matrices semi-solides et denses de SUV de concentrations élevées en lipides (500-665 mM) obtenus par la méthode d'hydratation du film lipidique (Bangham *et al.*, 1965a) suivie d'une homogénéisation à haute pression (70 MPa) (Kaiser *et al.*, 2003). Le 5-FU est encapsulé au moment de l'hydratation du film ou par incubation avec des SUV préformés. Les VPG obtenus sont dispersés dans un tampon aqueux avant utilisation. En raison de leur teneur élevée en lipides qui conduit à un volume aqueux interne plus élevé, les VPG sont adaptés à l'encapsulation des PA hydrosolubles avec une EE élevée de plus de 50% (Brandl *et al.*, 1998). L'encapsulation du 5-FU dans les VPG a donné une EE de 39,6% mais on observe une libération rapide à pH 8 en 20 min (Kaiser *et al.*, 2003). Enfin, l'inconvénient des VPG est l'hétérogénéité de la taille des SUV ce qui impose une étape supplémentaire de filtration avant leur utilisation.

Un autre moyen pour optimiser l'encapsulation du 5-FU dans les liposomes consiste à synthétiser des dérivés lipophiles du 5-FU et de les incorporer dans la bicouche lipidique lors de l'étape de préparation du film lipidique (Semakov *et al.*, 2013). L'encapsulation des dérivés lipophiles a été décrite comme facile et permettant d'obtenir des vésicules stables dans le sang avec un transfert transmembranaire du dérivé lipophile aux cellules tumorales. La synthèse de dérivés lipophiles est possible par le biais de la N-acylation du 5-FU en position 1. Les dérivés acylés aliphatiques n'offrent pas une meilleure stabilité en raison de leur hydrolyse en milieu acide alors que le dérivé O-toluy-5-FU a produit d'excellents résultats d'encapsulation (EE 100%) (Semakov *et al.*, 2013). Outre une étape de synthèse chimique supplémentaire, l'inconvénient de cette méthode réside dans le fait que le dérivé lipophile obtenu n'est pas cytotoxique par lui-même et que l'hydrolyse de la prodrogue est nécessaire afin de libérer le 5-FU dans la cellule tumorale.

Récemment une nouvelle stratégie pour améliorer l'encapsulation et la rétention du 5-FU au sein des liposomes a été décrite par Thomas *et al.* (Thomas *et al.*, 2011). Cette stratégie consiste à complexer le 5-FU dans la cavité aqueuse des liposomes préformés encapsulant un complexe cuivre (II)-polyéthylèneimine (Cu-PEI) afin d'augmenter la MM du 5-FU, de réduire sa perméabilité à travers la bicouche et ainsi de le piéger à l'intérieur des liposomes. Cette technique a montré une efficacité d'encapsulation, définie par l'auteur comme étant le rapport final 5-FU/lipid sur le rapport initial 5-FU/lipid, de plus de 90% quand le 5-FU était incubé avec les liposomes préformés à 50°C pendant une heure. Les liposomes encapsulant le complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI sont stables à 4°C pendant 2 mois. Ces liposomes libèrent 60% du 5-FU encapsulé en 24 h en milieu tamponné à pH 7,5 à température ambiante. Lorsqu'ils sont dilués dans 80% de sérum de vœu fœtal ils libèrent 80% en 24 h à pH 7,5 à 37°C (Thomas *et al.*, 2011).

L'effet cytotoxique du 5-FU étant dose-dépendant, il est important d'optimiser son efficacité d'encapsulation et sa rétention de sorte que les liposomes initialement chargés de la dose thérapeutique de 5-FU parviennent au tissu tumoral avec la charge initiale de PA. Un effet anticancéreux est dans ce cas-là envisageable si le 5-FU est complètement libéré dans la tumeur, d'où l'intérêt d'une libération active déclenchée par l'HT à partir de LTS. Peu d'études *in vivo* sur l'efficacité anti-tumorale de 5-FU encapsulé dans des liposomes sont rapportées dans la littérature. Sur un modèle de cancer du côlon métastatique chez le rat WAG/Rij l'injection par voie IV du 5-FU libre ou encapsulé dans des liposomes de HSPC/CHOL/DCP/DSPE-PEG₃₀₀₀ (45,5/45,5/4,5/4,5 mol%) a montré aucune amélioration de la survie par rapport au contrôle négatif (sérum physiologique) à 21 jours post-traitement (Pohlen *et al.*, 2012). Dans une autre étude, l'efficacité thérapeutique du complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI dans des liposomes de DSPC/CHOL (55/45 mol%) a été évaluée chez la souris Rag-2M porteuse de tumeur colorectale HT-29. Un traitement par voie intrapéritonéale pendant 5 jours avec des liposomes de complexe ternaire (20 mg/kg une injection/jour) a montré une meilleure activité thérapeutique que le 5-FU libre, indépendamment de la dose injectée. L'administration des deux formes de 5-FU à la dose de 20 mg/kg, permet de retarder la croissance tumorale de 5 jours (-30% en volume) avec le 5-FU libre et de 9 jours (-52% en volume) avec les liposomes de 5-FU par rapport au contrôle, respectivement (Thomas *et al.*, 2011).

8. Conclusion

Cette revue de la littérature nous a permis d'identifier l'existence de nombreuses formulations de LTST furtifs composés généralement d'un mélange de DPPC, DSPC ou HSPC,

CHOL et DSPE-PEG₂₀₀₀. Ces LTST furtifs ont permis de développer de multiples applications et ouvert la voie vers des débouchés cliniques en termes de vectorisation de molécules thérapeutiques (Allen and Cullis, 2004). Notamment dans le domaine de l'oncologie où les LTST sont capables d'encapsuler des PA anticancéreux, de circuler et de transporter le PA, de cibler la tumeur et d'y libérer le PA afin d'exercer l'effet thérapeutique envisagé et d'éviter les toxicités non spécifiques vis-à-vis des tissus sains. Leur composition chimique permet l'obtention de nanovecteurs possédant les propriétés suivantes : un long temps de résidence dans la circulation systémique grâce au lipide DSPE-PEG₂₀₀₀, une accumulation préférentielle dans la tumeur par effet EPR en raison de leur taille nanométrique (< 200 nm), et une libération exclusive de leur charge en PA dans la tumeur en réponse à une HT locale modérée (39-42°C) grâce à leur propriété de thermosensibilité conférée par la DPPC. Au vue de la complexité des liposomes à ciblage actif dans le cas où les liposomes vectorisent des PA non macromoléculaires tels que le 5-FU, il nous a semblé plus pertinent de travailler avec un modèle de liposomes PEGylés en utilisant du ciblage passif. Egalement, de nombreuses études ont démontré l'intérêt des LTSL qui se caractérisent par une libération ultrarapide (> 90% en 5 min) de leur contenu en réponse à une HT locale modérée (41 à 42°C). Cependant, ces LTSL sont moins stables que les LTST à 37°C et libèrent le PA encapsulé dans les microvaisseaux de la tumeur. Vu le problème de rétention intraliposomale du 5-FU et sa grande perméation à travers la bicouche lipidique, il nous a semblé plus intéressant de développer des LTST en vue de favoriser une rétention optimale du 5-FU à 37°C. Il est important de noter que la seule formulation liposomale thermosensible qui a réussi à passer en phase III des essais cliniques est la ThermoDox[®] qui est une formulation de LTSL furtifs chargés de doxorubicine.

Le 5-FU est un agent anticancéreux de la classe des anti-métabolites, il représente un PA clé prescrit dans le traitement de différents types de cancers solides. Ses cibles principales de toxicité constituent l'ADN, l'ARN, et la TS sur lesquels ses métabolites phosphorylés actifs agissent et inhibent la multiplication cellulaire. Le 5-FU constitue un candidat rationnel pour une forme vectorisée en raison de sa courte demi-vie plasmatique et sa dégradation par l'enzyme DPD. Il a été largement étudié sous forme encapsulée dans les liposomes. Néanmoins, à ce jour, aucune formulation liposomale thermosensible à base de 5-FU n'a été développée. Cela est dû à ses propriétés physico-chimiques qui empêchent une encapsulation stable à l'intérieur des liposomes comme discuté ci-dessus. Afin d'améliorer la rétention du 5-FU dans la cavité aqueuse des liposomes, il a été complexé à un complexe métallique composé du Cu (II) et du polymère de faible MM, la PEI₈₀₀. Le Cu (II) forme les complexes de coordination les plus stables à cause de sa forte affinité pour la PEI (nombre d'électrons plus élevé) (von

Zelewsky *et al.*, 1993), par conséquent, nous nous sommes intéressés au Cu (II), plus particulièrement à l'acétate de Cu.

Les complexes métalliques peuvent favoriser l'encapsulation efficace des PA qui ont une faible EE ou une faible stabilité d'encapsulation dans les liposomes tels que le 5-FU. Plusieurs cas ont été investigués : la formation de complexe de type PA-ligand, PA-métal et PA-métal-ligand à l'intérieur de liposomes préformés. Dans toutes ces situations la complexation du PA constitue la force motrice de l'accumulation du PA dans la cavité aqueuse des liposomes. Les essais de Thomas *et al.* (Thomas *et al.*, 2011) sur l'encapsulation du 5-FU par complexation avec la PEI₈₀₀ (Figure 14) préalablement encapsulée à l'intérieur de liposomes préformés ont montré une EE de moins de 20%. En effet, au pH physiologique, le 5-FU est une molécule neutre qui peut être facilement déprotonée en position 1 ou 3 ce qui conduirait à une interaction électrostatique avec la PEI polycationique. La faible EE dans les liposomes contenant uniquement la PEI₈₀₀ suggère que cette interaction n'était pas suffisante pour promouvoir le chargement du 5-FU.

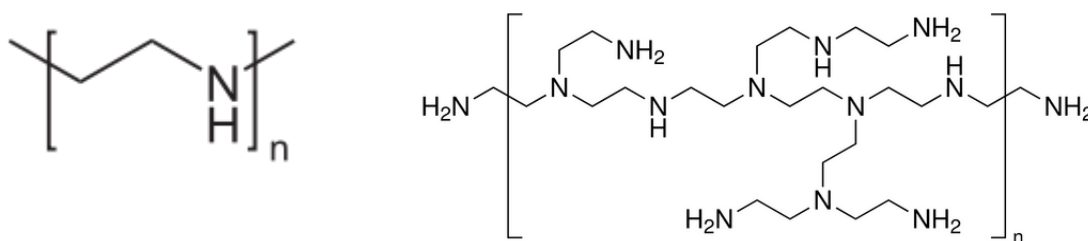


Figure 14. Structures chimiques de l'éthylèneimine (gauche) et de la PEI₈₀₀ branchée (droite). Adaptée de Avanti Polar Lipids.

D'autre part, les PA qui possèdent des sites de coordination (i.e. groupements amines), capables de complexer les ions métalliques tels que la doxorubicine, la vincristine, la camptothécine etc. (Cheung *et al.*, 1998), ont montré une encapsulation efficace par complexation avec les métaux. Si cette technique s'est avérée efficace dans le cas de ces PA, Thomas *et al.* (Thomas *et al.*, 2011), ont montré qu'aucune encapsulation du 5-FU ne s'est produite à l'intérieur de liposomes préformés encapsulant le sulfate de Cu ou l'acétate de Cu. Ce qui signifie que la complexation du 5-FU avec les ions cuivriques n'est pas favorable à la promotion de l'accumulation intraliposomale du 5-FU. La complexation du 5-FU avec le complexe métallique Cu-PEI induit une encapsulation supérieure à 90% et rétention optimisées du 5-FU sous forme de complexe ternaire dans les liposomes. Le complexe binaire Cu-PEI s'avère indispensable afin de favoriser l'encapsulation du 5-FU dans des liposomes préformés. A notre connaissance, les travaux de Thomas *et al.* (Thomas *et al.*, 2011) sont les seuls qui ont

porté sur l'amélioration de l'encapsulation et de la rétention liposomale du 5-FU par complexation, ce qui a favorisé l'amélioration de l'effet anticancéreux.

Cette revue de la littérature a montré que la combinaison de LTST à une source d'HT locale modérée, particulièrement les US, possède des propriétés intéressantes en termes d'amélioration du taux de libération du PA anticancéreux dans la tumeur, d'efficacité thérapeutique et de réduction de la toxicité non spécifique. Toutefois, il est intéressant de noter que les gains de l'index thérapeutique ont été plus du côté de la réduction de la toxicité que du côté de la plus grande efficacité. Les liposomes ont une faible extravasation dans les tissus avec des jonctions endothéliales serrées, ce qui conduit à une réduction significative des effets indésirables du PA encapsulé par rapport à la forme non encapsulée. Un excellent exemple est la réduction significative de la cardiotoxicité irréversible de la doxorubicine libre lorsque le PA est piégé dans des liposomes. La plupart des effets toxiques des PA sont réduits quand ils sont piégés dans des liposomes; et les seuls cas, où une augmentation de la toxicité n'a été notée sur le plan clinique, sont l'apparition de l'inflammation des muqueuses et l'augmentation d'une forme réversible de la toxicité de la peau appelée « syndrome main-pied », ou aussi érythrodysesthésie palmo-plantaire (PPE; également décrite pour certaines perfusions prolongées sans PA (Lokich and Moore, 1984)), lorsque les anthracyclines liposomales à longue circulation sont administrés (Lotem *et al.*, 2000). L'administration de PA sous forme vectorisée dans les liposomes est devenue une plate-forme établie et acceptée en clinique. Nous pouvons nous attendre à beaucoup plus de produits basés sur des petites molécules dans l'avenir. Cela nous encourage donc à concevoir des LTST furtifs encapsulant le 5-FU sous forme de complexe métallique ternaire (Figure 15).

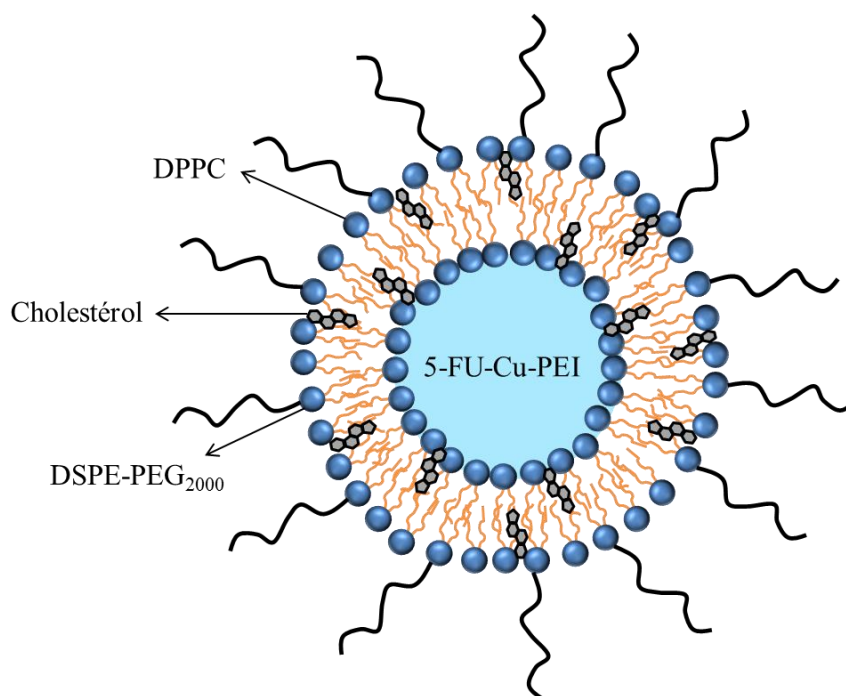


Figure 15. Schéma d'un LTST furtif chargé du complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI.

Cependant, une formulation de LTST doit répondre à un cahier de charge qui résume les propriétés indispensables à une vectorisation performante :

- EE correspondante à la dose thérapeutique requise.
- Stabilité d'encapsulation pendant la conservation ainsi que dans la circulation sanguine (rétention *in vitro* et *in vivo*) grâce au complexe Cu-PEI.
- Protection du PA encapsulé de toute biotransformation inactivante grâce au liposome.
- Propriétés physicochimiques adaptées à une circulation sanguine prolongée grâce au diamètre et à la charge de surface.
- Furtivité à l'égard du SPM (temps de circulation prolongé) grâce au CHOL et au DSPE-PEG₂₀₀₀.
- Ciblage passif de la tumeur grâce au temps de circulation plasmatique prolongé et à l'effet EPR.
- Libération efficace au sein de la tumeur déclenchée par une HT locale grâce à la propriété de thermosensibilité de la bicouche.
- Bonne efficacité anti-tumorale grâce à la capacité du PA libéré à diffuser dans la MEC et à pénétrer dans la cellule tumorale.

Références

- Agarwal, A., Mackey, M. A., El-Sayed, M. A. and Bellamkonda, R. V. (2011). "Remote Triggered Release of Doxorubicin in Tumors by Synergistic Application of Thermosensitive Liposomes and Gold Nanorods." ACS Nano **5**(6): 4919-4926.
- Ahmad, I., Longenecker, M., Samuel, J. and Allen, T. M. (1993). "Antibody-targeted delivery of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes can eradicate lung-cancer in mice." Cancer Research **53**(7): 1484-1488.
- Ahmed, M., Moussa, M. and Goldberg, S. N. (2012). "Synergy in cancer treatment between liposomal chemotherapeutics and thermal ablation." Chemistry and Physics of Lipids **165**(4): 424-437.
- Al-Jamal, W. T., Al-Ahmady, Z. S. and Kostarelos, K. (2012). "Pharmacokinetics & tissue distribution of temperature-sensitive liposomal doxorubicin in tumor-bearing mice triggered with mild hyperthermia." Biomaterials **33**(18): 4608-4617.
- Allen, C., Dos Santos, N., Gallagher, R., Chiu, G. N. C., Shu, Y., Li, W. M., Johnstone, S. A., Janoff, A. S., Mayer, L. D., Webb, M. S. and Bally, M. B. (2002). "Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol)." Bioscience Reports **22**(2): 225-250.
- Allen, T. M. (1994). "The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system." Advanced Drug Delivery Reviews **13**(3): 285-309.
- Allen, T. M. and Chonn, A. (1987). "Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system." FEBS Letters **223**(1): 42-46.
- Allen, T. M. and Cleland, L. G. (1980). "Serum-induced leakage of liposome contents " Biochimica Et Biophysica Acta **597**(2): 418-426.
- Allen, T. M. and Cullis, P. R. (2004). "Drug delivery systems: Entering the mainstream." Science **303**(5665): 1818-1822.
- Allen, T. M. and Cullis, P. R. (2013). "Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications." Advanced Drug Delivery Reviews **65**(1): 36-48.
- Allen, T. M. and Hansen, C. (1991). "Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1068**(2): 133-141.
- Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C. and Yau-Young, A. (1991). "Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1066**(1): 29-36.
- Arulsudar, N., Subramanian, N., Mishra, P., Sharma, R. K. and Murthy, R. S. R. (2003). "Preparation, characterisation and biodistribution of Tc-99m-labeled liposome encapsulated cyclosporine." Journal of Drug Targeting **11**(3): 187-196.

- Awasthi, V. D., Garcia, D., Goins, B. A. and Phillips, W. T. (2003). "Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits." International Journal of Pharmaceutics **253**(1-2): 121-132.
- Awasthi, V. D., Garcia, D., Klipper, R., Goins, B. A. and Phillips, W. T. (2004). "Neutral and anionic liposome-encapsulated hemoglobin: Effect of postinserted poly(ethylene glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine on distribution and circulation kinetics." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **309**(1): 241-248.
- Banerjee, J., Hanson, A. J., Gadam, B., Elegbede, A. I., Tobwala, S., Ganguly, B., Wagh, A. V., Muhonen, W. W., Law, B., Shabb, J. B., Srivastava, D. K. and Mallik, S. (2009). "Release of Liposomal Contents by Cell-Secreted Matrix Metalloproteinase-9." Bioconjugate Chemistry **20**(7): 1332-1339.
- Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C. (1965a). "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids." Journal of Molecular Biology **13**(1): 238-252.
- Bangham, A. D., Standish, M. M. and Weissmann, G. (1965b). "The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations." Journal of Molecular Biology **13**(1): 253-259.
- Banno, B., Ickenstein, L. M., Chiu, G. N. C., Bally, M. B., Thewalt, J., Brief, E. and Wasan, E. K. (2010). "The Functional Roles of Poly(Ethylene Glycol)-Lipid and Lysolipid in the Drug Retention and Release from Lysolipid-Containing Thermosensitive Liposomes In Vitro and In Vivo." Journal of Pharmaceutical Sciences **99**(5): 2295-2308.
- Benoît, J. P., Briançon, S., Fattal, E., Fessi, H., Legrand, P. and Passirani, C. (2007). Sphéroïdes et formes vectorisées. Pharmacie Galénique: Formulation et Technologie pharmaceutique. Maloine. France: 221-250.
- Berger, N., Sachse, A., Bender, J., Schubert, R. and Brandl, M. (2001). "Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics." International Journal of Pharmaceutics **223**(1-2): 55-68.
- Bloom, M., Evans, E. and Mouritsen, O. G. (1991). "Physical-properties of the fluid lipid-bilayer component of cell-membranes - A perspective " Quarterly Reviews of Biophysics **24**(3): 293-397.
- Blume, G. and Cevc, G. (1993). "Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in vivo." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1146**(2): 157-168.
- Boman, N. L., Masin, D., Mayer, L. D., Cullis, P. R. and Bally, M. B. (1994). "Liposomal vincristine which exhibits increased drug retention and increased circulation longevity cures mice bearing P388 tumors." Cancer Research **54**(11): 2830-2833.
- Brandl, M., Drechsler, M., Bachmann, D., Tardi, C., Schmidtgen, M. and Bauer, K.-H. (1998). "Preparation and characterization of semi-solid phospholipid dispersions and dilutions thereof." International Journal of Pharmaceutics **170**(2): 187-199.
- Bringas, E., Koysuren, O., Quach, D. V., Mahmoudi, M., Aznar, E., Roehling, J. D., Marcos, M. D., Martinez-Manez, R. and Stroeve, P. (2012). "Triggered release in lipid bilayer-capped

mesoporous silica nanoparticles containing SPION using an alternating magnetic field." Chemical Communications **48**(45): 5647-5649.

Carion-Taravella, B., Lesieur, S., Chopineau, J., Lesieur, P. and Ollivon, M. (2002). "Phase behavior of mixed aqueous dispersions of dipalmitoylphosphatidylcholine and dodecyl glycosides: A differential scanning calorimetry and X-ray diffraction investigation." Langmuir **18**(2): 325-335.

Cavalli, S., Tipton, A. R., Overhand, M. and Kros, A. (2006). "The chemical modification of liposome surfaces via a copper-mediated 3+2 azide-alkyne cycloaddition monitored by a colorimetric assay." Chemical Communications(30): 3193-3195.

Celsion (2014). THERMODOX, http://celsion.com/docs/technology_thermodox.

Celsion (2014). THERMODOX® — Pipeline within a program, http://celsion.com/docs/pipeline_overview.

Chadwick, M. and Rogers, W. I. (1972). "Physiological disposition of 5-Fluorouracil in mice bearing solid L1210 lymphocytic leukemia." Cancer Research **32**(5): 1045-&.

Cheung, B. C. L., Sun, T. H. T., Leenhouts, J. M. and Cullis, P. R. (1998). "Loading of doxorubicin into liposomes by forming Mn²⁺-drug complexes." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1414**(1-2): 205-216.

Chiu, G. N. C., Abraham, S. A., Ickenstein, L. M., Ng, R., Karlsson, G., Edwards, K., Wasan, E. K. and Bally, M. B. (2005). "Encapsulation of doxorubicin into thermosensitive liposomes via complexation with the transition metal manganese." Journal of Controlled Release **104**(2): 271-288.

Coley, W. B. (1911). "I. Injury as a Causative Factor in Cancer." Ann Surg **53**(4): 449-488.

Cullis, P. R. (1976). "Lateral diffusion rates of phosphatidylcholine in vesicle membranes - Effects of cholesterol and hydrocarbon phase-transitions." FEBS Letters **70**(1): 223-228.

de Smet, M., Heijman, E., Langereis, S., Hijnen, N. M. and Groll, H. (2011). "Magnetic resonance imaging of high intensity focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: An in vivo proof-of-concept study." Journal of Controlled Release **150**(1): 102-110.

Degennes, P. G. (1980). "Conformations of polymers attached to an interface." Macromolecules **13**(5): 1069-1075.

Delattre, J., Couvreur, P., Puisieux, F., Philippot, J. R. and Schuber, F. (1993). Les liposomes aspects technologiques biologiques et pharmacologiques. Paris.

Desmettre, T., Mordon, S., Soulie, S., Devoisselle, J. M. and Weisslinger, J. M. (1996). "Liposomes in ophthalmology: Review of the literature." Journal Francais D Ophthalmologie **19**(11): 716-731.

Diasio, R. and Harris, B. (1989). "Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil." Clinical Pharmacokinetics **16**(4): 215-237.

- Djanashvili, K., ten Hagen, T. L. M., Blangé, R., Schipper, D., Peters, J. A. and Koning, G. A. (2011). "Development of a liposomal delivery system for temperature-triggered release of a tumor targeting agent, Ln(III)-DOTA-phenylboronate." Bioorganic & Medicinal Chemistry **19**(3): 1123-1130.
- Douillard, J. Y., Cunningham, D., Roth, A. D., Navarro, M., James, R. D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., Gruia, G., Awad, L. and Rougier, P. (2000). "Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial." The Lancet **355**(9209): 1041-1047.
- Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K. L., Kirpotin, D. B. and Papahadjopoulos, D. (1999). "Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors." Pharmacological Reviews **51**(4): 691-743.
- El-Khoueiry, A. B. and Lenz, H. J. (2006). "Should continuous infusion 5-fluorouracil become the standard of care in the USA as it is in Europe?" Cancer Investigation **24**(1): 50-55.
- El-Samaligy, M. S., Afifi, N. N. and Mahmoud, E. A. (2006). "Increasing bioavailability of silymarin using a buccal liposomal delivery system: Preparation and experimental design investigation." International Journal of Pharmaceutics **308**(1-2): 140-148.
- El Maghraby, G. M. M., Williams, A. C. and Barry, B. W. (2005). "Drug interaction and location in liposomes: correlation with polar surface areas." International Journal of Pharmaceutics **292**(1-2): 179-185.
- Er, Y., Barnes, T. J., Fornasiero, D. and Prestidge, C. A. (2009). "The encapsulation and release of guanosine from PEGylated liposomes." Journal of Liposome Research **19**(1): 29-36.
- Escoffre, J. M., Novell, A., de Smet, M. and Bouakaz, A. (2013). "Focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: in-vitro characterization and validation." Physics in Medicine and Biology **58**(22): 8135-8151.
- Feldborg, L. N., Jolck, R. I. and Andresen, T. L. (2012). "Quantitative Evaluation of Bioorthogonal Chemistries for Surface Functionalization of Nanoparticles." Bioconjugate Chemistry **23**(12): 2444-2450.
- Fendler, J. H. (1984). "Polymerized surfactant vesicles - Novel membrane mimetic systems." Science **223**(4639): 888-894.
- Fresta, M., Villari, A., Puglisi, G. and Cavallaro, G. (1993). "5-Fluorouracil: various kinds of loaded liposomes: encapsulation efficiency, storage stability and fusogenic properties." International Journal of Pharmaceutics **99**(2-3): 145-156.
- Fuly, A. L., Calil-Elias, S., Martinez, A. M. B., Melo, P. A. and Guimarães, J. A. (2003). "Myotoxicity induced by an acidic Asp-49 phospholipase A2 isolated from Lachesis muta snake venom: Comparison with lysophosphatidylcholine." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **35**(10): 1470-1481.
- Gaber, M. H., Hong, K. L., Huang, S. K. and Papahadjopoulos, D. (1995). "Thermosensitive sterically stabilized liposomes - Formulation and in-vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma." Pharmaceutical Research **12**(10): 1407-1416.

Gabizon, A., Price, D. C., Huberty, J., Bresalier, R. S. and Papahadjopoulos, D. (1990). "Effect of Liposome Composition and Other Factors on the Targeting of Liposomes to Experimental Tumors: Biodistribution and Imaging Studies." Cancer Research **50**(19): 6371-6378.

Gabizon, A. A. (1992). "Selective tumor-localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes." Cancer Research **52**(4): 891-896.

Garg, A., Tisdale, A. W., Haidari, E. and Kokkoli, E. (2009). "Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide." International Journal of Pharmaceutics **366**(1-2): 201-210.

Giacchetti, S., Perpoint, B., Zidani, R., Le Bail, N., Faggiuolo, R., Focan, C., Chollet, P., Llory, J. F., Letourneau, Y., Coudert, B., Bertheaut-Cvitkovic, F., Larregain-Fournier, D., Le Rol, A., Walter, S., Adam, R., Misset, J. L. and Lévi, F. (2000). "Phase III Multicenter Randomized Trial of Oxaliplatin Added to Chronomodulated Fluorouracil-Leucovorin as First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer." Journal of Clinical Oncology **18**(1): 136.

Glavas-Dodov, M., Fredro-Kumbaradzi, E., Goracinova, K., Simonoska, M., Calis, S., Trajkovic-Jolevska, S. and Hincal, A. A. (2005). "The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU." International Journal of Pharmaceutics **291**(1-2): 79-86.

Gregoria, G. and Neerunju, D. (1974). "Control of rate of hepatic uptake and catabolism of liposome-entrapped proteins injected into rats - Possible therapeutic applications." European Journal of Biochemistry **47**(1): 179-185.

Gregoriadis, G. (1988). Liposomes as drug carriers : recent trends and progress. New York, Chichester ; New York : Wiley.

Grüll, H. and Langereis, S. (2012). "Hyperthermia-triggered drug delivery from temperature-sensitive liposomes using MRI-guided high intensity focused ultrasound." Journal of Controlled Release **161**(2): 317-327.

Hahn, B. H., Knotts, L., Ng, M. and Hamilton, T. R. (1975). "Influence of cyclophosphamide and other immunosuppressive drugs on immune disorders and neoplasia in NZB/NZW mice." Arthritis Rheum **18**(2): 145-152.

Heggie, G. D., Sommadossi, J.-P., Cross, D. S., Huster, W. J. and Diasio, R. B. (1987). "Clinical Pharmacokinetics of 5-Fluorouracil and Its Metabolites in Plasma, Urine, and Bile." Cancer Research **47**(8): 2203-2206.

Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Plevin, E. and Scheiner, J. (1957). "Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds." Nature **179**(4561): 663-666.

Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M. and Jain, R. K. (1997). "Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation." Nature Medicine **3**(2): 177-182.

Herold, D. A., Keil, K. and Bruns, D. E. (1989). "Oxidation of polyethylen glycols by alcohol-dehydrogenase." Biochemical Pharmacology **38**(1): 73-76.

Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T., Felix, R. and Riess, H. (2002). "The cellular and molecular basis of hyperthermia." Critical Reviews in Oncology/Hematology **43**(1): 33-56.

Hong, R.-L., Huang, C.-J., Tseng, Y.-L., Pang, V. F., Chen, S.-T., Liu, J.-J. and Chang, F.-H. (1999). "Direct Comparison of Liposomal Doxorubicin with or without Polyethylene Glycol Coating in C-26 Tumor-bearing Mice: Is Surface Coating with Polyethylene Glycol Beneficial?" Clinical Cancer Research **5**(11): 3645-3652.

Houghton, J. A., Houghton, P. J. and Wooten, R. S. (1979). "Mechanism of Induction of Gastrointestinal Toxicity in the Mouse by 5-Fluorouracil, 5-Fluorouridine, and 5-Fluoro-2'-deoxyuridine." Cancer Research **39**(7 Part 1): 2406-2413.

Hryniuk, W. M., Figueredo, A. and Goodyear, M. (1987). "Applications of dose intensity to problems in chemotherapy of breast and colorectal-cancer." Seminars in Oncology **14**(4): 3-11.

Huang, S. K., Stauffer, P. R., Hong, K. L., Guo, J. W. H., Phillips, T. L., Huang, A. and Papahadjopoulos, D. (1994). "Liposomes and hyperthermia in mice - Increased tumor uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in sterically stabilized liposomes." Cancer Research **54**(8): 2186-2191.

Hwang, K. J., Padki, M. M., Chow, D. D., Essien, H. E., Lai, J. Y. and Beaumier, P. L. (1987). "Uptake of small liposomes by non-reticuloendothelial tissues." Biochimica Et Biophysica Acta **901**(1): 88-96.

Immordino, M. L., Dosio, F. and Cattel, L. (2006). "Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential." International Journal of Nanomedicine **1**(3): 297-315.

Inoue, T., Hibi, K., Nakayama, G., Komatsu, Y., Fukuoka, T., Kodera, Y., Ito, K., Akiyama, S. and Nakao, A. (2005). "Expression level of thymidylate synthase is a good predictor of chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer." Journal of Gastroenterology **40**(2): 143-147.

Ishida, T., Takanashi, Y., Doi, H., Yamamoto, I. and Kiwada, H. (2002). "Encapsulation of an antivasospastic drug, fasudil, into liposomes, and in vitro stability of the fasudil-loaded liposomes." International Journal of Pharmaceutics **232**(1-2): 59-67.

Israelachvili, J. N. and Mitchell, D. J. (1975). "A model for the packing of lipids in bilayer membranes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **389**(1): 13-19.

Jain, R. K. and Stylianopoulos, T. (2010). "Delivering nanomedicine to solid tumors." Nature Reviews Clinical Oncology **7**(11): 653-664.

Johnston, M. J. W., Edwards, K., Karlsson, G. and Cullis, P. R. (2008). "Influence of drug-to-lipid ratio on drug release properties and liposome integrity in liposomal doxorubicin formulations." Journal of Liposome Research **18**(2): 145-157.

Johnston, M. J. W., Semple, S. C., Klimuk, S. K., Edwards, K., Eisenhardt, M. L., Leng, E. C., Karlsson, G., Yanko, D. and Cullis, P. R. (2006). "Therapeutically optimized rates of drug release can be achieved by varying the drug-to-lipid ratio in liposomal vincristine formulations." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1758**(1): 55-64.

Juliano, R. L. and Stamp, D. (1978). "Pharmacokinetics of liposome-encapsulated anti-tumor drugs - Studies with vinblastine, actinomycin-d, cytosine-arabinoside, and daunomycin." Biochemical Pharmacology **27**(1): 21-27.

Kaiser, N., Kimpfler, A., Massing, U., Burger, A. M., Fiebig, H. H., Brandl, M. and Schubert, R. (2003). "5-Fluorouracil in vesicular phospholipid gels for anticancer treatment: entrapment and release properties." International Journal of Pharmaceutics **256**(1-2): 123-131.

Karlsson, M., Nolkrantz, K., Davidson, M. J., Strömberg, A., Ryttsén, F., Åkerman, B. and Orwar, O. (2000). "Electroinjection of Colloid Particles and Biopolymers into Single Unilamellar Liposomes and Cells for Bioanalytical Applications." Analytical Chemistry **72**(23): 5857-5862.

Kheirrolomoom, A., Lai, C.-Y., Tam, S. M., Mahakian, L. M., Ingham, E. S., Watson, K. D. and Ferrara, K. W. (2013). "Complete regression of local cancer using temperature-sensitive liposomes combined with ultrasound-mediated hyperthermia." Journal of Controlled Release **172**(1): 266-273.

Kheirrolomoom, A., Mahakian, L. M., Lai, C.-Y., Lindfors, H. A., Seo, J. W., Paoli, E. E., Watson, K. D., Haynam, E. M., Ingham, E. S., Xing, L., Cheng, R. H., Borowsky, A. D., Cardiff, R. D. and Ferrara, K. W. (2010). "Copper-Doxorubicin as a Nanoparticle Cargo Retains Efficacy with Minimal Toxicity." Molecular Pharmaceutics **7**(6): 1948-1958.

Kirby, C. and Gregoriadis, G. (1984). "Dehydration-rehydration vesicles - A simple method for high-yield drug entrapment in liposomes." Bio-Technology **2**(11): 979-984.

Kirpotin, D. B., Drummond, D. C., Shao, Y., Shalaby, M. R., Hong, K. L., Nielsen, U. B., Marks, J. D., Benz, C. C. and Park, J. W. (2006). "Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models." Cancer Research **66**(13): 6732-6740.

Kong, G., Anyarambhatla, G., Petros, W. P., Braun, R. D., Colvin, O. M., Needham, D. and Dewhirst, M. W. (2000). "Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: Importance of triggered drug release." Cancer Research **60**(24): 6950-6957.

Kong, G., Braun, R. D. and Dewhirst, M. W. (2001). "Characterization of the Effect of Hyperthermia on Nanoparticle Extravasation from Tumor Vasculature." Cancer Research **61**(7): 3027-3032.

Kumar, A., Erasquin, U. J., Qin, G. T., Li, K. and Cai, C. Z. (2010). "'Clickable', polymerized liposomes as a versatile and stable platform for rapid optimization of their peripheral compositions." Chemical Communications **46**(31): 5746-5748.

Kuribayashi, K., Tresset, G., Ph, C., Fujita, H. and Takeuchi, S. (2006). "Electroformation of giant liposomes in microfluidic channels." Measurement Science and Technology **17**(12): 3121.

Laginha, K., Mumbengegwi, D. and Allen, T. (2005). "Liposomes targeted via two different antibodies: Assay, B-cell binding and cytotoxicity." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1711**(1): 25-32.

- Laginha, K. M., Verwoert, S., Charrois, G. J. R. and Allen, T. M. (2005). "Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors." Clinical Cancer Research **11**(19): 6944-6949.
- Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W. E. and Storm, G. (2012). "Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress." Journal of Controlled Release **161**(2): 175-187.
- Lasic, D. D. (1998). "Novel applications of liposomes." Trends in Biotechnology **16**(7): 307-321.
- Lasic, D. D., Frederik, P. M., Stuart, M. C. A., Barenholz, Y. and McIntosh, T. J. (1992). "Gelation of liposome interior A novel method for drug encapsulation." FEBS Letters **312**(2-3): 255-258.
- Lasic, D. D., Martin, F. J., Gabizon, A., Huang, S. K. and Papahadjopoulos, D. (1991). "Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1070**(1): 187-192.
- Lasic, D. D. and Needham, D. (1995). "The "Stealth" Liposome: A Prototypical Biomaterial." Chemical Reviews **95**(8): 2601-2628.
- Lee, S.-M., Park, H., Choi, J.-W., Park, Y. N., Yun, C.-O. and Yoo, K.-H. (2011). "Multifunctional Nanoparticles for Targeted Chemophotothermal Treatment of Cancer Cells." Angewandte Chemie International Edition **50**(33): 7581-7586.
- Lembersky, B. C., Wieand, H. S., Petrelli, N. J., O'Connell, M. J., Colangelo, L. H., Smith, R. E., Seay, T. E., Giguere, J. K., Marshall, M. E., Jacobs, A. D., Colman, L. K., Soran, A., Yothers, G. and Wolmark, N. (2006). "Oral Uracil and Tegafur Plus Leucovorin Compared With Intravenous Fluorouracil and Leucovorin in Stage II and III Carcinoma of the Colon: Results From National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol C-06." Journal of Clinical Oncology **24**(13): 2059-2064.
- Li, L., ten Hagen, T. L. M., Schipper, D., Wijnberg, T. M., van Rhoon, G. C., Eggermont, A. M. M., Lindner, L. H. and Koning, G. A. (2010). "Triggered content release from optimized stealth thermosensitive liposomes using mild hyperthermia." Journal of Controlled Release **143**(2): 274-279.
- Li, L. H., Dong, H., Zhao, F., Tang, J., Chen, X., Ding, J., Men, H. T., Luo, W. X., Du, Y., Ge, J., Tan, B. X., Cao, D. and Liu, J. Y. (2013). "The upregulation of dihydropyrimidine dehydrogenase in liver is involved in acquired resistance to 5-fluorouracil." European Journal of Cancer **49**(7): 1752-1760.
- Lokich, J. J. and Moore, C. (1984). "Chemotherapy-Associated Palmar-Plantar Erythrodysesthesia Syndrome." Annals of Internal Medicine **101**(6): 798-800.
- Longley, D. B., Harkin, D. P. and Johnston, P. G. (2003). "5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies." Nature Reviews Cancer **3**(5): 330-338.
- Lotem, M., Hubert, A., Lyass, O., Goldenhersh, M. A., Ingber, A., Peretz, T. and Gabizon, A. (2000). "Skin toxic effects of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin." Archives of Dermatology **136**(12): 1475-1480.

- Ma, Y. S., Yang, I. P., Tsai, H. L., Huang, C. W., Juo, S. H. H. and Wang, J. Y. (2014). "High Glucose Modulates Antiproliferative Effect and Cytotoxicity of 5-Fluorouracil in Human Colon Cancer Cells." DNA and Cell Biology **33**(2): 64-72.
- MacMillan, W. E., Wolberg, W. H. and Welling, P. G. (1978). "Pharmacokinetics of Fluorouracil in Humans." Cancer Research **38**(10): 3479-3482.
- Maeda, H. (2012). "Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond." Journal of Controlled Release **164**(2): 138-144.
- Markiewski, M. M., Nilsson, B., Ekdahl, K. N., Mollnes, T. E. and Lambris, J. D. (2007). "Complement and coagulation: strangers or partners in crime?" Trends in Immunology **28**(4): 184-192.
- Maruyama, K., Takizawa, T., Yuda, T., Kennel, S. J., Huang, L. and Iwatsuru, M. (1995). "Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal-antibodies." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1234**(1): 74-80.
- Matsubara, I., Kamiya, J. and Imai, S. (1980). "Cardiotoxic effects of 5-Fluorouracil in the guinea pig." The Japanese Journal of Pharmacology **30**(6): 871-879.
- Matsumura, Y., Gotoh, M., Muro, K., Yamada, Y., Shirao, K., Shimada, Y., Okuwa, M., Matsumoto, S., Miyata, Y., Ohkura, H., Chin, K., Baba, S., Yama, T., Kannami, A., Takamatsu, Y., Ito, K. and Takahashi, K. (2004). "Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer." Annals of Oncology **15**(3): 517-525.
- Mayer, L. D., Tai, L. C. L., Bally, M. B., Mitlenes, G. N., Ginsberg, R. S. and Cullis, P. R. (1990). "Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients." Biochimica Et Biophysica Acta **1025**(2): 143-151.
- Mills, J. K. and Needham, D. (2005). "Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1716**(2): 77-96.
- Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., Ando, T., Yazaki, N., Watanabe, K., Haneda, S., Shibata, C. and Sasaki, I. (2010). "5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs." Cancers **2**(3): 1717-1730.
- Moghim, S. M., Andersen, A. J., Hashemi, S. H., Lettier, B., Ahmadvand, D., Hunter, A. C., Andresen, T. L., Hamad, I. and Szebeni, J. (2010). "Complement activation cascade triggered by PEG-PL engineered nanomedicines and carbon nanotubes: The challenges ahead." Journal of Controlled Release **146**(2): 175-181.
- Moghim, S. M., Hamad, I., Andresen, T. L., Jørgensen, K. and Szebeni, J. (2006). "Methylation of the phosphate oxygen moiety of phospholipid-methoxy(polyethylene glycol) conjugate prevents PEGylated liposome-mediated complement activation and anaphylatoxin production." The FASEB Journal **20**(14): 2591-2593.

- Moghimi, S. M. and Szebeni, J. (2003). "Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties." Progress in Lipid Research **42**(6): 463-478.
- Morgan, J. R., Williams, L. A. and Howard, C. B. (1985). "Technetium-labeled liposome imaging for deep-seated infection." British Journal of Radiology **58**(685): 35-39.
- Nag, O. K., Yadav, V. R., Hedrick, A. and Awasthi, V. (2013). "Post-modification of preformed liposomes with novel non-phospholipid poly(ethylene glycol)-conjugated hexadecylcarbamoylmethyl hexadecanoic acid for enhanced circulation persistence in vivo." International Journal of Pharmaceutics **446**(1-2): 119-129.
- Nakamura, K., Yamashita, K., Itoh, Y., Yoshino, K., Nozawa, S. and Kasukawa, H. (2012). "Comparative studies of polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different PEG-modification methods." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1818**(11): 2801-2807.
- Needham, D., Anyambhatla, G., Kong, G. and Dewhirst, M. W. (2000). "A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: Characterization and testing in a human tumor xenograft model." Cancer Research **60**(5): 1197-1201.
- Needham, D., Park, J. Y., Wright, A. M. and Tong, J. H. (2013). "Materials characterization of the low temperature sensitive liposome (LTSL): effects of the lipid composition (lysolipid and DSPE-PEG2000) on the thermal transition and release of doxorubicin." Faraday Discussions **161**: 515-534.
- Ning, S. C., Macleod, K., Abra, R. M., Huang, A. H. and Hahn, G. M. (1994). "Hyperthermia induces doxorubicin release from long-circulating liposomes and enhances their antitumor efficacy." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics **29**(4): 827-834.
- Novell, A., Escoffre, J. M., Al-Sabbagh, C., Mannaris, C., Fattal, E., Tsapis, N., Averkiou, M. and Bouakaz, A. (2012). Role of thermal and mechanical effects on drug release from thermosensitive nanocarriers. Ultrasonics Symposium (IUS), 2012 IEEE International.
- Okeda, R., Shibutani, M., Matsuo, T., Kuroiwa, T., Shimokawa, R. and Tajima, T. (1990). "Experimental neurotoxicity of 5-Fluorouracil and its derivatives is due to poisoning by the monofluorinated organic metabolites, monofluoroacetic acid and alpha-fluoro-beta-alanine " Acta Neuropathologica **81**(1): 66-73.
- Ong, W., Yang, Y., Cruciano, A. C. and McCarley, R. L. (2008). "Redox-Triggered Contents Release from Liposomes." Journal of the American Chemical Society **130**(44): 14739-14744.
- Orcutt, K. D., Rhoden, J. J., Ruiz-Yi, B., Frangioni, J. V. and Wittrup, K. D. (2012). "Effect of Small-Molecule-Binding Affinity on Tumor Uptake In Vivo: A Systematic Study Using a Pretargeted Bispecific Antibody." Molecular Cancer Therapeutics **11**(6): 1365-1372.
- Owusu, R. A., Abern, M. R. and Inman, B. A. (2013). "Hyperthermia as Adjunct to Intravesical Chemotherapy for Bladder Cancer." BioMed Research International **2013**: 7.
- Ozer, A. Y. and Talsma, H. (1989). "Preparation and stability of liposomes containing 5-fluorouracil." International Journal of Pharmaceutics **55**(2-3): 185-191.

Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S. K., Lee, K. D., Woodle, M. C., Lasic, D. D. and Redemann, C. (1991). "Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy." Proceedings of the National Academy of Sciences **88**(24): 11460-11464.

Papahadjopoulos, D. and Gabizon, A. A. (1995). Sterically stabilized (Stealth®) liposomes: Pharmacological properties and drug carrying potential in cancer Liposomes as Tools in Basic Research and Industry. J. R. Philippot and F. Schuber. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc: 177-188.

Park, J. W., Hong, K. L., Kirpotin, D. B., Colbern, G., Shalaby, R., Baselga, J., Shao, Y., Nielsen, U. B., Marks, J. D., Moore, D., Papahadjopoulos, D. and Benz, C. C. (2002). "Anti-HER2 immunoliposomes: Enhanced efficacy attributable to targeted delivery." Clinical Cancer Research **8**(4): 1172-1181.

Pasut, G. and Veronese, F. M. (2007). "Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies." Progress in Polymer Science **32**(8-9): 933-961.

Pohlen, U., Buhr, H., Berger, G., Ritz, J.-P. and Holmer, C. (2012). "Hepatic arterial infusion (HAI) with PEGylated liposomes containing 5-FU improves tumor control of liver metastases in a rat model." Investigational New Drugs **30**(3): 927-935.

Popović, Z., Liu, W., Chauhan, V. P., Lee, J., Wong, C., Greytak, A. B., Insin, N., Nocera, D. G., Fukumura, D., Jain, R. K. and Bawendi, M. G. (2010). "A Nanoparticle Size Series for In Vivo Fluorescence Imaging." Angewandte Chemie International Edition **49**(46): 8649-8652.

Pradhan, P., Giri, J., Rieken, F., Koch, C., Mykhaylyk, O., Dobliger, M., Banerjee, R., Bahadur, D. and Plank, C. (2010). "Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy." Journal of Controlled Release **142**(1): 108-121.

Presant, C. A., Proffitt, R. T., Turner, A. F., Williams, L. E., Winsor, D., Werner, J. L., Kennedy, P., Wiseman, C., Gala, K., McKenna, R. J., Smith, J. D., Bouzagliou, S. A., Callahan, R. A., Baldeschwieler, J. and Crossley, R. J. (1988). "Successful imaging of human cancer with indium-111-labeled phospholipid-vesicles." Cancer **62**(5): 905-911.

Proffitt, R. T., Williams, L. E., Presant, C. A., Tin, G. W., Uliana, J. A., Gamble, R. C. and Baldeschwieler, J. D. (1983). "Liposomal blockade of the reticuloendothelial system - Improved tumor imaging with small unilamellar vesicles." Science **220**(4596): 502-505.

Redziniak, G. (2003). "Liposomes et peau : passé, présent, futur." Pathologie Biologie **51**(5): 279-281.

Rickwood, D. and Hames, D. (1989). Liposomes a practical approach. New York, Oxford University Press.

Riviere, K., Huang, Z. H., Jerger, K., Macaraeg, N. and Szoka, F. C. (2011). "Antitumor effect of folate-targeted liposomal doxorubicin in KB tumor-bearing mice after intravenous administration." Journal of Drug Targeting **19**(1): 14-24.

Schiffelers, R. M., Koning, G. A., ten Hagen, T. L. M., Fens, M. H. A. M., Schraa, A. J., Janssen, A. P. C. A., Kok, R. J., Molema, G. and Storm, G. (2003). "Anti-tumor efficacy of

tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin." Journal of Controlled Release **91**(1-2): 115-122.

Schroeder, A., Goldberg, M. S., Kastrup, C., Wang, Y., Jiang, S., Joseph, B. J., Levins, C. G., Kannan, S. T., Langer, R. and Anderson, D. G. (2012). "Remotely Activated Protein-Producing Nanoparticles." Nano Letters **12**(6): 2685-2689.

Schroeder, A., Kost, J. and Barenholz, Y. (2009). "Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes." Chemistry and Physics of Lipids **162**(1-2): 1-16.

Schuetz, J. D., Wallace, H. J. and Diasio, R. B. (1984). "5-Fluorouracil Incorporation into DNA of CF-1 Mouse Bone Marrow Cells as a Possible Mechanism of Toxicity." Cancer Research **44**(4): 1358-1363.

Semakov, A. V., Blinkov, A. A., Gaenko, G. P., Vostrova, A. G. and Molotkovsky, J. G. (2013). "Synthesis and properties of lipophilic derivatives of 5-fluorouracil." Russian Journal of Bioorganic Chemistry **39**(3): 299-305.

Semple, S. C., Chonn, A. and Cullis, P. R. (1996). "Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes." Biochemistry **35**(8): 2521-2525.

Senior, J. and Gregoriadis, G. (1982). "Is half-life of circulating liposomes determined by changes in their permeability." FEBS Letters **145**(1): 109-114.

Shimada, K., Matsuo, S., Sadzuka, Y., Miyagishima, A., Nozawa, Y., Hirota, S. and Sonobe, T. (2000). "Determination of incorporated amounts of poly(ethylene glycol)-derivatized lipids in liposomes for the physicochemical characterization of stealth liposomes." International Journal of Pharmaceutics **203**(1-2): 255-263.

Silvander, M., Johnsson, M. and Edwards, K. (1998). "Effects of PEG-lipids on permeability of phosphatidylcholine/cholesterol liposomes in buffer and in human serum." Chemistry and Physics of Lipids **97**(1): 15-26.

Skipper, H. E., Schabel, F. M. and Wilcox, W. S. (1964). "Experimental evaluation of potential anticancer agents .13. On the criteria and kinetics associated with curability of experimental leukemia." Cancer Chemotherapy Reports(35): 3-111.

Sugiyama, I. and Sadzuka, Y. (2013). "Change in the Character of Liposomes as a Drug Carrier by Modifying Various Polyethyleneglycol-Lipids." Biological and Pharmaceutical Bulletin **36**(6): 900-906.

Szleifer, I., Gerasimov, O. V. and Thompson, D. H. (1998). "Spontaneous liposome formation induced by grafted poly(ethylene oxide) layers: Theoretical prediction and experimental verification." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(3): 1032-1037.

Tagami, T., Ernsting, M. J. and Li, S.-D. (2011). "Efficient tumor regression by a single and low dose treatment with a novel and enhanced formulation of thermosensitive liposomal doxorubicin." Journal of Controlled Release **152**(2): 303-309.

- Tan, C. P. and Nakajima, M. (2005). "beta-Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation." Food Chemistry **92**(4): 661-671.
- Thomas, A. M., Kapanen, A. I., Hare, J. I., Ramsay, E., Edwards, K., Karlsson, G. and Bally, M. B. (2011). "Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-Fluorouracil for parenteral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy." Journal of Controlled Release **150**(2): 212-219.
- Torchilin, V. P. (2005). "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers." Nature Reviews Drug Discovery **4**(2): 145-160.
- Tsukada, K., Ueda, S. and Okada, R. (1984). "Preparation of Liposome-Encapsulated Anti-tumor Drugs ; Relationship between Lipophilicity of Drugs and in Vitro Drug Release." Chemical & pharmaceutical bulletin **32**(5): 1929-1935.
- Unezaki, S., Maruyama, K., Takahashi, N., Koyama, M., Yuda, T., Suginaka, A. and Iwatsuru, M. (1994). "Enhanced delivery and antitumor-activity of doxorubicin using long-circulating thermosensitive liposomes containing amphipathic polyethylene-glycol in combination with local hyperthermia." Pharmaceutical Research **11**(8): 1180-1185.
- Uster, P. S., Allen, T. M., Daniel, B. E., Mendez, C. J., Newman, M. S. and Zhu, G. Z. (1996). "Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time." FEBS Letters **386**(2-3): 243-246.
- van der Heijden, A. G., Verhaegh, G., Jansen, C. F., Schalken, J. A. and Witjes, J. A. (2005). "Effect of hyperthermia on the cytotoxicity of 4 chemotherapeutic agents currently used for the treatment of transitional cell carcinoma of the bladder: an in vitro study." Journal of Urology **173**(4): 1375-1380.
- Viroonchatapan, E., Sato, H., Ueno, M., Adachi, I., Tazawa, K. and Horikoshi, I. (1997). "Release of 5-fluorouracil from thermosensitive magnetoliposomes induced by an electromagnetic field." Journal of Controlled Release **46**(3): 263-271.
- von Zelewsky, A., Barbosa, L. and Schlöpfer, C. W. (1993). "Poly(ethylenimines) as Brønsted bases and as ligands for metal ions." Coordination Chemistry Reviews **123**(1-2): 229-246.
- Vujaskovic, Z., Kim, D. W., Jones, E., Lan, L., McCall, L., Dewhirst, M. W., Craciunescu, O., Stauffer, P., Liotcheva, V., Betof, A. and Blackwell, K. (2010). "A phase I/II study of neoadjuvant liposomal doxorubicin, paclitaxel, and hyperthermia in locally advanced breast cancer." International Journal of Hyperthermia **26**(5): 514-521.
- Wang, A. Z., Langer, R. and Farokhzad, O. C. (2012). Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. Annual Review of Medicine, Vol 63. C. T. Caskey, C. P. Austin and J. A. Hoxie. Palo Alto, Annual Reviews. **63**: 185-198.
- Wang, S., Zhang, X., Yu, B., Lee, R. J. and Lee, L. J. (2010). "Targeted nanoparticles enhanced flow electroporation of antisense oligonucleotides in leukemia cells." Biosensors and Bioelectronics **26**(2): 778-783.
- Weinstein, J. N., Magin, R. L., Yatvin, M. B. and Zaharko, D. S. (1979). "Liposomes and local hyperthermia - Selective delivery of methotrexate to heated tumors." Science **204**(4389): 188-191.

Wilson, P. M., El-Khoueiry, A., Iqbal, S., Fazzone, W., LaBonte, M. J., Groshen, S., Yang, D. Y., Danenberg, K. D., Cole, S., Kornacki, M., Ladner, R. D. and Lenz, H. J. (2010). "A phase I/II trial of vorinostat in combination with 5-fluorouracil in patients with metastatic colorectal cancer who previously failed 5-FU-based chemotherapy." Cancer Chemotherapy and Pharmacology **65**(5): 979-988.

Wohlhueter, R. M., McIvor, R. S. and Plagemann, P. G. (1980). "Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells." Journal of Cellular Physiology **104**(3): 309-319.

Woodbury, D. J., Richardson, E. S., Grigg, A. W., Welling, R. D. and Knudson, B. H. (2006). "Reducing Liposome Size with Ultrasound: Bimodal Size Distributions." Journal of Liposome Research **16**(1): 57-80.

Yan, B., Ouyang, R., Huang, C., Liu, F., Neill, D., Li, C. and Dewhirst, M. (2012). "Heat induces gene amplification in cancer cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **427**(3): 473-477.

Yatvin, M. B., Weinstein, J. N., Dennis, W. H. and Blumenthal, R. (1978). "Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia " Science **202**(4374): 1290-1293.

Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D. A., Torchilin, V. P. and Jain, R. K. (1995). "Vascular-permeability in a human tumor xenograft - Molecular-size dependence and cutoff size." Cancer Research **55**(17): 3752-3756.

Yuda, T., Maruyama, K. and Iwatsuru, M. (1996). "Prolongation of liposome circulation time by various derivatives of polyethyleneglycols." Biological & Pharmaceutical Bulletin **19**(10): 1347-1351.

Zacharski, L. R. and Sukhatme, V. P. (2005). "Coley's toxin revisited: immunotherapy or plasminogen activator therapy of cancer?" J Thromb Haemost **3**(3): 424-427.

Zalipsky, S. (1995). "Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates." Bioconjugate Chemistry **6**(2): 150-165.

Travaux expérimentaux

Introduction

L'efficacité des liposomes thermosensibles traditionnels (LTST) à favoriser la libération contrôlée de PA anticancéreux au niveau tumoral semble être très prometteuse, ce qui nous permet d'envisager leur utilisation en tant que vecteurs de 5-Fluorouracile (5-FU) pour le traitement du carcinome colorectal.

Au cours de ce travail de thèse, deux formulations liposomales encapsulant le 5-FU ont été développées et caractérisées sur le plan physico-chimique et biologique. Concernant le choix de lipides, nous nous sommes intéressés à la DPPC car elle présente une température de transition de phase (T_m) de $41,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ dans la plage adéquate pour les formulations thermosensibles. L'utilisation du CHOL nous a semblé pertinente au vu de la revue de la littérature et ce dans un double objectif : stabilité sanguine des liposomes une fois injectés par voie intraveineuse et modulation de leur thermosensibilité en fonction de la teneur en CHOL. Quant à l'utilisation du DSPE-PEG₂₀₀₀ à 5 mol%, il a été rapporté qu'il s'insère au niveau de la bicouche lipidique et stabilise stériquement la surface des liposomes en inhibant l'adsorption des opsonines sériques ce qui prolonge leur temps de résidence dans la circulation sanguine. Ce lipide est utilisé dans des formulations liposomales approuvées par la FDA depuis 1995 pour une administration en clinique en vue d'améliorer leur demi-vie plasmatique.

Nous nous sommes également intéressés au 5-FU en tant que PA anticancéreux hydrophile à encapsuler dans la cavité aqueuse de nos liposomes. Comme rapporté dans la littérature, le 5-FU souffre essentiellement d'une faible rétention intraliposomale. Il en résulte une sortie prématurée à l'extérieur des liposomes au cours de la conservation mais aussi après injection *in vivo* ce qui limite à présent le succès du 5-FU liposomal. Cependant, Thomas *et al.* (Thomas *et al.*, 2011) ont démontré récemment la propriété du 5-FU à former des complexes de coordination avec les métaux de transition tels que le Cu en présence d'un ligand tel que la PEI ce qui améliore la rétention intraliposomale du complexe ternaire formé 5-FU-Cu-PEI. En conséquence cette stratégie nous a semblé intéressante à appliquer dans la conception des LTST (désignés dans les trois chapitres suivants par LTS et en anglais TSLs). La présente étude a porté à la fois sur l'encapsulation du 5-FU non complexé mais aussi sur l'encapsulation du complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI.

La nanotoxicologie est une nouvelle sous-discipline de la toxicologie qui étudie la toxicité de nanoparticules, qui servent de véhicules de PA, vis-à-vis de l'organisme. Elle constitue une étape importante du développement de nouveaux nanomédicaments. Etant donné que la complexation du 5-FU pourrait altérer ses propriétés cytotoxiques, il nous a semblé judicieux

de tester son effet anticancéreux après complexation. Afin de mimer les conditions colorectales, nous avons donc évalué la toxicité *in vitro* des liposomes et du 5-FU sous ses différentes formes (libre, encapsulé, complexé ou non) sur la lignée de cellules épithéliales HT-29 provenant du carcinome colorectal humain. Par ailleurs, nous avons évalué la pharmacocinétique et la biodistribution des LTST et de leurs contrôles négatifs *in vivo* chez la souris nude porteuse d'un modèle de tumeur colorectale xénogreffée HT-29.

Les résultats de ces recherches sont présentés sous forme de trois chapitres :

Le premier chapitre s'intéresse à la préparation ainsi qu'à l'optimisation du diamètre de différents types de liposomes, à l'évaluation de leur thermosensibilité en fonction de leur contenu en CHOL. La capacité de ces liposomes à libérer une molécule modèle encapsulée dans leur cavité aqueuse, la calcéïne, sous l'effet d'une hyperthermie (HT) a ensuite été évaluée et a permis de comparer l'efficacité de l'HT engendrée par des ultrasons focalisés à celle obtenue dans un bain-marie thermostaté.

Le deuxième chapitre présente les résultats d'encapsulation du 5-FU dans deux types de liposomes contenant deux pourcentages différents de CHOL et qui représentent les LTST et leur contrôle non thermosensible. Egalement, dans ce chapitre, les techniques adoptées pour optimiser l'encapsulation du 5-FU notamment par complexation avec le Cu et la PEI sont décrites. La libération du 5-FU *in vitro* induite par l'HT a été étudiée et a permis de comparer encore une fois l'efficacité de l'HT engendrée par des FUS à celle obtenue dans un bain-marie thermostaté. Finalement, les résultats de cytotoxicité *in vitro* des formulations sont exposés.

Le troisième chapitre de cette thèse rapporte les résultats de pharmacocinétique et de distribution tissulaire obtenus *in vivo* chez la souris nude porteuse d'un modèle de tumeur colorectale xénogreffée HT-29.

Suite à ces trois chapitres, viennent la partie portant sur les travaux de recherche non soumis à publication, la discussion générale des résultats obtenus ainsi que les conclusions et les perspectives.

Chapitre 1

Evaluation *in vitro* des effets thermique et mécanique des ultrasons focalisés sur la libération de calcéine à partir de liposomes thermosensibles

Chapitre 1 :

Evaluation *in vitro* des effets thermique et mécanique des ultrasons focalisés sur la libération de calcéine à partir de liposomes thermosensibles

Chantal Al Sabbagh^{1,2*}, Anthony Novell^{3,4*}, Jean-Michel Escoffre^{3,5}, Cédric Gaillard⁶, Nicolas Tsapis^{1,2}, Elias Fattal^{1,2} et Ayache Bouakaz³.

¹ Univ Paris-Sud, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

² CNRS UMR 8612, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

³ UMR, Inserm U 930, Université François Rabelais, Tours, France.

⁴ Joint Department of Biomedical Engineering, The University of North Carolina and North Carolina State University, Chapel Hill, NC 27599, USA.

⁵ Imaging Division, UMC Utrecht, Utrecht, Netherlands.

⁶ INRA-UR1268 BIA - Plate-forme BIBS, Nantes, France.

*Les deux auteurs ont contribué d'une façon égale à ce travail.

Etude soumise à publication dans International Journal of Hyperthermia

Résumé

Les ultrasons focalisés (FUS) représentent une technologie polyvalente pour les thérapies thermiques non invasives en oncologie. Par ailleurs, les FUS se caractérisent par un grand potentiel pour la délivrance de principes actifs (PA) médiée par l'hyperthermie (HT) locale à partir de liposomes thermosensibles (LTS), améliorant ainsi l'efficacité thérapeutique et réduisant les profils de toxicité. Outre l'effet thermique, les FUS induisent des contraintes mécaniques sur les liposomes.

Dans la présente étude, nous avons évalué l'influence des effets thermique et mécanique des FUS sur la libération d'une molécule hydrophile modèle, la calcéine, à partir de LTS. La libération de calcéine *in vitro* à partir de liposomes thermosensibles (LTS, DPPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ : 90/5/5 mol%) et à partir de liposomes non thermosensibles (LNTS, DPPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ : 65/30/5 mol%) a été mesurée par spectrofluorimétrie après exposition des liposomes à une HT générée par un bain-marie ou des FUS.

L'échauffement des LTS à 42°C dans un bain-marie ou par des ondes sinusoïdales de FUS de 1 MHz (pic de pression négative 1,5 MPa), de fréquence de répétition des impulsions de 1 ms et de rapport cyclique 40%, pendant 10 min induit une libération de calcéine avoisinant 45%. En revanche, aucune libération de calcéine n'a été détectée lorsque les LNTS ont été chauffés dans un bain-marie. D'autre part, un accroissement de la libération de calcéine de plus de 10% a été décelé à partir des LTS et des LNTS pour des pressions acoustiques comprises entre 1,5 MPa et 2 MPa. Cette augmentation de la libération est attribuée à la contrainte mécanique générée par les FUS à hautes pressions, qui est suffisamment élevée pour provoquer la rupture de la bicouche lipidique. De plus, l'analyse des images obtenues par cryo-TEM a montré une diminution significative de la taille des LTS (14%) induite par l'effet thermique des FUS, tandis que les contraintes mécaniques des FUS n'entraînent aucun effet supplémentaire sur le diamètre.

***In vitro* evaluation of focused ultrasound-mediated thermal and mechanical effects on the calcein release from temperature-sensitive liposomes**

Chantal Al Sabbagh^{1,2*}, Anthony Novell^{3,4*}, Jean-Michel Escoffre^{3,5}, Cédric Gaillard⁶, Nicolas Tsapis^{1,2}, Elias Fattal^{1,2} et Ayache Bouakaz³.

¹ Univ Paris-Sud, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

² CNRS UMR 8612, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

³ UMR, Inserm U 930, Université François Rabelais, Tours, France.

⁴ Joint Department of Biomedical Engineering, The University of North Carolina and North Carolina State University, Chapel Hill, NC 27599, USA.

⁵ Imaging Division, UMC Utrecht, Utrecht, Netherlands.

⁶ INRA-UR1268 BIA - Plate-forme BIBS, Nantes, France.

*Both the authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Anthony Novell, PhD.

Joint Department of Biomedical Engineering, The University of North Carolina, Taylor Hall - room 331, Chapel Hill, NC 27599, USA

Tel: 919 843 6196

Email: annovell@email.unc.edu

Abstract

Focused ultrasound (FUS) is a versatile technology for non-invasive thermal therapies in oncology. Indeed, this technology has great potential for local heat-mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes (TSLs), improving thus the therapeutic efficacy and reducing toxicity profiles. Besides thermal effects, FUS also induces mechanical stresses on nanoparticles.

In the present study, we evaluated the influence of FUS-mediated thermal and non-thermal effects on the release of calcein from TSLs, used to model a hydrophilic drug. Quantitative calcein release from temperature-sensitive liposomes (TSLs, DPPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀: 90/5/5) and non-temperature-sensitive liposomes (NTSLs, DPPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀: 65/30/5) was measured by spectrofluorimetry after both water-bath and FUS-induced *in vitro* heating.

Calcein release reaches a plateau (around 45%) when TSLs were heated at temperature above 42°C in a water-bath. A similar percentage of calcein release was achieved when TSLs were exposed to 1 MHz sinusoidal waves at peak negative pressures of 1.5 MPa, 40% duty cycle, for 10 min. No release was detected when NTSLs were heated in a water-bath. For both TSLs and NTSLs, the calcein release was increased by more than 10% for acoustic pressures ranging from 1.5 MPa to 2 MPa. This additional release was attributed to the mechanical stress generated by FUS, which was sufficient to disrupt the liposomal membrane. Furthermore, analysis of cryo-TEM images showed a significant decrease of the liposome size (14%) induced by the thermal effect whereas the liposome diameter remained unaffected by the FUS-triggered non-thermal effects.

Keywords: Temperature-sensitive liposomes, Focused ultrasound, Drug delivery, Mild hyperthermia, Mechanical stress.

1. Introduction

The early use of free anticancer drugs in conventional anticancer chemotherapy revealed that their therapeutic efficacy is strongly limited by potentially life-threatening toxicities due to an undesired high drug accumulation in healthy tissues. Nevertheless, recent developments in pharmaceutical nanotechnology offers attractive features to overcome these limitations (Jain and Stylianopoulos, 2010): (i) the ability to protect and encapsulate anticancer drugs into nanoparticles (*e.g.*, liposomes) limiting thus the unspecific accumulation of free drugs in healthy tissues, (ii) the nanometer size of nanoparticles and their PEGylation allowing a long circulatory half-life and the selective delivery of anticancer drugs to solid tumors by the enhanced permeability and retention effect (*i.e.*, EPR effect) (Lim *et al.*, 2014). Altogether these properties have provided viable methods to increase therapeutic efficacy and to reduce the severe side-effects of anticancer drugs in healthy tissues (Wang *et al.*, 2012). Nowadays, the FDA and EMEA have clinically approved the use of several drug-loaded nanoparticles such as Doxil[®] for treatment of Kaposi sarcoma, breast and ovarian cancers (Barenholz, 2012) and Abraxane[®] for metastatic breast cancer (Gradishar *et al.*, 2005; Gaitanis and Staal, 2010). These treatments increase the therapeutic efficacy of drugs and reduce their side-effects in healthy tissues (*e.g.*, cardiotoxicity with Doxil[®]) (Jain and Stylianopoulos, 2010). Nevertheless, the nanoparticle accumulation in the tumor tissue does not necessarily result in higher intratumoral concentration of drugs (Al-Ahmady *et al.*, 2012; Al-Jamal *et al.*, 2012). Indeed, the drug release from the nanoparticles is a slow phenomenon dependent on passive leakage, which controls the therapeutic efficacy. In addition, these treatments, which exploit the EPR effect, are not relevant for all tumor stages since the tumor vasculature is particularly dependent on the tumor type and growth-state (Blanco *et al.*, 2011). In this context, the design of responsive nanoparticles that will release the loaded anticancer drugs in response to external stimuli in the tumor is greatly desirable (Yan *et al.*, 2012). Over the last decades, chemical and physical stimuli including pH (Yu *et al.*, 2014), temperature (de Smet *et al.*, 2010) and electric field (Ge *et al.*, 2012) have been investigated to trigger drug release from nanoparticles.

Among these physical stimuli, focused ultrasound (FUS) is a completely non-invasive technology using an external ultrasound transducer to deposit a high acoustic intensity precisely into a volume of interest within deep-situated tissues, providing thus either a strong mechanical and/or thermal stimulus (Schroeder *et al.*, 2009). Ultrasound-mediated mechanical stimulus has been reported to enhance the extravasation of free drug (Khaibullina *et al.*, 2008) and drug-loaded liposomes (Frenkel *et al.*, 2006) from the tumor vascular compartment into tumor

interstitial tissues. In addition, mechanical stimuli including inertial cavitation (Somaglino *et al.*, 2011; Lafon *et al.*, 2012; Evjen *et al.*, 2013) and acoustic streaming (Oerlemans *et al.*, 2013) serves as an external trigger for targeted drug release from nanoparticles through the pore formation in the liposome bilayers or the disruption of liposomes. High intensity focused ultrasound (HIFU) has been investigated for non-invasive thermal ablation of pathological tissues (50-100°C for a shorter time period) under the guidance of magnetic resonance imaging (Hynynen, 2011; Ward, 2011). Nowadays, this technology is clinically approved for the treatment of uterine fibroids and recently for prostate cancer (Hesley *et al.*, 2013; Napoli *et al.*, 2013). Recent investigations support the extended use of this method for temperature-induced local drug delivery at mild hyperthermia (41-43°C for 0.5-1h) using FUS at intensities lower than those used in HIFU applications (de Smet *et al.*, 2011; Negussie *et al.*, 2011; Ranjan *et al.*, 2012; Staruch *et al.*, 2012). Mild hyperthermia has been shown to improve the accumulation of drug-loaded nanoparticles (Matteucci *et al.*, 2000) within the heated lesion through increased perfusion and vascular permeability (Kong and Dewhirst, 1999; Kong *et al.*, 2001) and serves as an external trigger for targeted drug release from temperature-sensitive liposomes (TSLs) (Yatvin *et al.*, 1978; Kong and Dewhirst, 1999). As TSLs release loaded anticancer drugs at the melting phase transition temperature (T_m) of the lipid bilayer (*i.e.*, 41-43°C), the exposure of tumor tissue to mild hyperthermia of 41-43°C induces local release of the anticancer drugs within the heated lesion only (Yatvin *et al.*, 1978; Needham *et al.*, 2000; Mackay and Chilkoti, 2008). *In vitro* (Escoffre *et al.*, 2013; Mannaris *et al.*, 2013) and *in vivo* experiments (de Smet *et al.*, 2011; Kheirrolomoom *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013) with doxorubicin-loaded TSLs in association with FUS-mediated hyperthermia clearly reported an improved therapeutic efficacy of temperature-triggered drug delivery. These data revealed that the concentration of delivered anticancer drugs in the tumor cells and tissues depends on the liposome properties (Hossann *et al.*, 2010; Koning *et al.*, 2010; Grüll and Langereis, 2012), acoustic parameters (Ranjan *et al.*, 2012; Escoffre *et al.*, 2013) and the properties of tumor cells and tissues (Blanco *et al.*, 2011). The mechanisms involved in the drug release from TSLs remain to be further elucidated (Schroeder *et al.*, 2009). Among the hypothesized mechanisms, the formation of transient nanopores has been mainly suggested (de Smet *et al.*, 2011; Negussie *et al.*, 2011). Indeed, at the liposome T_m , pores are generated at the boundaries between solid and liquid crystalline domains in the phospholipid bilayer resulting in drug release. Most of the existing studies seem to exclude the mechanical contribution of FUS for the drug release as reported with non-temperature-sensitive liposomes (NTSLs) (Zhang *et al.*, 2009; Chen and Wu, 2010). Nevertheless, previous investigations described that the inertial cavitation induced during FUS

application could generate liposome ruptures due to mechanical stresses, thus allowing drug release (Schroeder *et al.*, 2009). The generation of membrane pores and liposomal membrane ruptures might be the cause of the drug release from the TSLs under the FUS-mediated mechanical and thermal constraints.

The aim of the present work is to develop PEGylated TSLs and NTSLs formulations and investigate the physical processes involved in the release of calcein, a model for a hydrophilic drug, from NTSLs and TSLs under FUS exposure. After the optimization of liposome size and their physicochemical characterization in terms of thermosensitivity, we determined the ultrasound conditions required to induce temperature increment required for satisfactory calcein release from TSLs. Then, we sought to determine the role of thermal and mechanical effects on drug release from TSLs using spectrofluorimetry and transmitted electron microscopy (TEM). Hence our study addresses the following questions: (i) using an *in vitro* FUS device, what are the optimal acoustic parameters that induce an efficient calcein release from TSLs? (ii) What is the predominant physical effect involved in the calcein release from TSLs?

2. Materials and methods

2.1. Materials

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC, $T_m = 41.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$) was purchased from Genzyme (Liestal, Switzerland) and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-PEG₂₀₀₀ (DSPE-PEG₂₀₀₀) from Avanti Polar Lipid Inc. (Alabaster, Alabama, USA). Cholesterol (CHOL), calcein and phosphate buffer saline (PBS) and Triton X-100 were obtained from Sigma-Aldrich® (St Quentin-Fallavier, France). All chemical substances and analytical grade solvents were used without further purification. Water was purified using a RIOS/Milli-Q system from Merck-Millipore (Molsheim, France).

2.2. Liposome preparation and calcein encapsulation

Calcein was used as a model hydrophilic drug (622.53 Da) and was encapsulated into TSLs and NTSLs. Liposomes were prepared from DPPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ using various molar ratios, by film hydration technique followed by extrusion and ultracentrifugation to remove non-encapsulated compounds. The molar percentage of DSPE-PEG₂₀₀₀ was fixed at 5% since it has been shown that this ratio leads to satisfyingly stealth liposomes (Li *et al.*, 2010). Formulations with 5, 10, 15, 20 and 30 mol% CHOL were prepared. Briefly, 1.2×10^{-4} mol of total lipids were dissolved into 10 mL of chloroform in a 50 mL round-bottomed flask. The solvent was evaporated under reduced pressure for 40 min at 45°C to form a thin lipid film.

Multilamellar liposomes were formed by hydration of the lipid film at 50°C with 10 mL phosphate buffer saline (PBS: 10 mM Phosphate, 138 mM NaCl, pH 7.4) containing or not 40 mM calcein. The resulting mixture was stirred vigorously followed by extrusion at 60°C, above the DPPC T_m , under nitrogen pressure (508 psi). The number of extrusion cycles was varied between 5 and 15 for size optimization studies and was fixed to 10 for calcein release studies. Liposomes suspensions were extruded through a stack of two 100 nm polycarbonate filters (Merck-Millipore). In order to remove non-encapsulated calcein, the liposome suspension was twice centrifuged at 150,000 g in a Beckman ultracentrifuge (Optima LE-80K, Beckman Coulter, USA) for 4 h at 4°C. The pellet obtained was re-suspended into 500 μ L of PBS and stored at 4°C in brown vials until use.

2.3. Dynamic light scattering

Mean hydrodynamic diameter (d_H) and polydispersity index (PDI) of the liposomes were determined using a Malvern Zetasizer Nano ZN (Malvern, UK, He-Ne laser) based on quasi-elastic light scattering. Measurements were carried out at 25°C and intensity correlation functions were measured at a scattering angle of 173° using a wavelength of 633 nm. The d_H was obtained from the Stokes-Einstein relation using the measured diffusion coefficient obtained from the fit.

2.4. Differential scanning calorimetry (DSC)

To test the phase transition temperature of the liposomes, films with various CHOL molar ratios (0, 5, 10, 15, 20 and 30 %) of 10 mg total lipids were hydrated with 100 μ L of PBS for at least 12h. Then, samples of about 5 mg were accurately weighed and analyzed in aluminum pans (40 μ L) by DSC (DSC7, Perkin-Elmer, USA) in the temperature range from 20 to 80°C at a rate of 5°C/min. Calibration was performed using Indium ($T_{onset} = 156.60^\circ\text{C}$) and n-decane ($T_{onset} = -9.66^\circ\text{C}$). Onset temperatures were determined and enthalpies were normalized with respect to DPPC weight in the sample.

2.5. Cholesterol-dependent calcein release

This assay was used to characterize the temperature sensitivity of the different liposome formulations as a function of CHOL molar percentage. It is based on the self-quenching property of calcein fluorescence when it is encapsulated at high concentration (40 mM) and the de-quenching ($< 15 \mu\text{M}$) when it is diluted into the surrounding medium upon release from liposomes (Supplementary Data, Figure S1). Calcein release from liposomes with various CHOL molar ratio (0, 5, 10, 15 and 30 %) was determined using a fluorescent spectrometer (LS 50B, Perkin Elmer, USA). Excitation and emission wavelengths were 485 and 520 nm,

respectively. For each liposomal formulation, samples were diluted in PBS before measurements and fluorescence intensity was monitored online during 5 min at desired temperature from 25 to 42°C. Finally, liposomes in the cuvette were destroyed by adding 62.5 µL Triton X-100, corresponding to 4% v/v final concentration, to measure the total fluorescence. Calcein efflux from liposomes at different temperatures was calculated as:

$$\% \text{ Release} = \frac{(F-F_0)}{(F_t-F_0)} \times 100 \quad (1)$$

Where F was the fluorescence intensity of the liposome sample at a specific temperature, F_0 the fluorescence intensity of the sample before heating and F_t the total fluorescence intensity of the liposomes after addition of Triton X-100.

2.6. *In vitro* FUS setup and experimental settings

Temperature increase into an *in vitro* setup was investigated as a function of the peak negative pressure (PNP) from 0 to 2 MPa, the duty cycle (DC) from 0 to 50% and the exposure time (from 0 to 30 min). An arbitrary function generator (33220A, Agilent, Palo Alto, CA) was used to design the excitation signal. Tone burst centered at 1 MHz was repeated with a fixed pulse repetition frequency (PRF) of 1 kHz. This signal was then amplified using a power amplifier (ADECE, Artannes sur Indre, France) and transmitted to a 1 MHz homemade single-element transducer focused at 48 mm with a diameter of 47 mm. The size of the focal spot (*i.e.*, at 48 mm) at -3 dB was 4 mm². FUS experiments were performed in a tank filled with degassed water and maintained at 37°C. A dual-compartment setup (Novell *et al.*, 2012) was positioned at the transducer focal distance (Figure 1A). The system consisted of a sample holder (30 mm height, 6 mm inside diameter, 8 mm outside diameter; Fischer Scientific SAS, Illkirch, France) containing 500 µL of PBS, placed into a glycerol-filled plastic cuvette (Figure 1B). Glycerol is a good thermally absorptive medium (like tissue), which can be used to heat the sample holder by FUS (Mannaris *et al.*, 2013). Indeed, the heat transfer by conduction from the surrounding glycerol induces a temperature increase in the sample holder. This setup, based on a secondary heating, reproduces the *in vivo* scenario where ultrasound induces hyperthermia in the tumor tissue and the liposomes accumulated in the tumor are heated by thermal conduction (Escoffre *et al.*, 2013). Over the sides of the dual-compartment setup, acoustical windows were made with 20-µm thick polyolefin heat shrink film (Rajashrink, Roissy, France) to avoid ultrasound attenuation (4% at 1 MHz) and reflection. Temperature measurements were performed using a fine-wire thermocouple (Dostmann electronic GmbH, Wertheim-Reicholzheim, Germany) positioned inside the sample holder for different acoustic parameters (*i.e.*, pressure, duty cycle or exposure time). The temperature increment was measured each 15 s during 10 min.

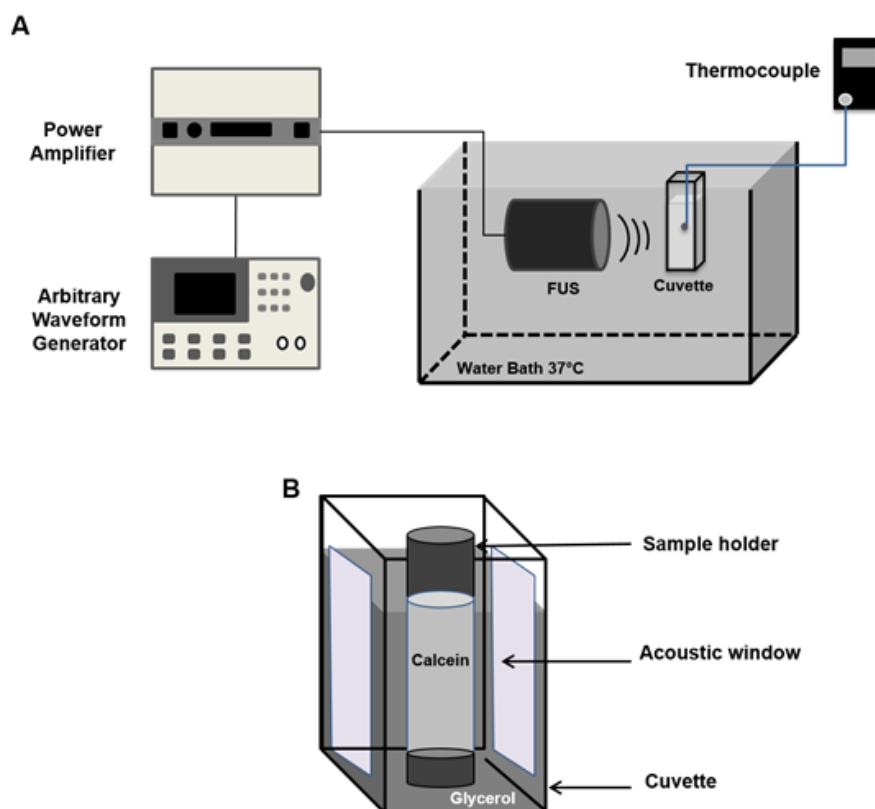


Figure 1. *In vitro* FUS setup (A) and dual-compartment setup (B) consisting in the sample holder placed into a glycerol-filled cuvette.

2.7. Activation protocol

For both water-bath and FUS experiments, 25 μL of calcein-loaded liposomes were diluted in 500 μL of PBS and placed into the sample holder. Both NTSLs and TSLs were evaluated and each experiment was independently repeated 3 times. For water-bath measurements, the temperature was varied from 37°C to 49°C. Samples were exposed to the different temperatures during 10 min. Furthermore, calcein release kinetic was measured using a water-bath at a fixed temperature of 42°C during 30 min. Similarly, samples were exposed to FUS using different acoustic pressures ranging from 0 to 2 MPa, 40% duty cycle, during 10 min. Calcein release kinetic was estimated for the FUS condition of 1.75 MPa, 40% duty cycle during an exposure time of 30 minutes. After water-bath or FUS heating, samples were cooled down in an ice bath and stored at 4°C. The calcein fluorescence was measured using a SpectraMax XPS Gemini (Molecular devices, Sunnyvale, CA) spectrofluorimeter ($\lambda_{\text{Ex}} = 485 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$). Complete liposome leakage (100%) was achieved by the addition of 10 μL of Triton X-100 (4%

v/v final concentration) in the liposome suspension. The percentage of calcein leakage was calculated using equation (1).

2.8. Cryo-transmission electron microscope (cryo-TEM) sample preparation

Specimens for cryo-TEM observation were prepared using a cryoplunging cryo-fixation device (Gatan, USA) in which a drop of the aqueous suspension was deposited on to glow-discharged holey-type carbon-coated grids (Ted Pella Inc., USA). The TEM grid was then prepared by blotting the drop containing the specimen to a thin liquid layer remained across the holes in the support carbon film. The liquid film was vitrified by rapidly plunging the grid into liquid ethane cooled by liquid nitrogen. The vitrified specimens were mounted in a Gatan 910 specimen holder (Gatan, USA) that was inserted in the microscope using a CT-3500-cryotransfer system (Gatan, USA) and cooled with liquid nitrogen. TEM images were then obtained from specimens preserved in vitreous ice and suspended across a hole in the supporting carbon substrate. The samples were observed under low dose conditions ($< 10 \text{ e}^-/\text{Å}^2$), at -178°C , using a JEM-1230 'Cryo' microscope (Jeol, Japan) operated at 80 kV and equipped with a LaB_6 filament. All the micrographs were recorded on a Gatan $1.35 \text{ K} \times 1.04 \text{ K} \times 12 \text{ bits}$ ES500W CCD camera. For each sample, the size the liposomes was measured using ImageJ software. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) of 100 independent measurements.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney U test (StatPlus[®]:mac, version 5.8.3.8. 2001-2009 Analyst Soft Inc.). Significance was defined as $p < 0.05$ (NS, non-significant; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$).

3. Results

3.1. Preparation, characterization and optimization of liposomes

To optimize liposome size around 100 nm, formulations with 5, 10 and 30% CHOL (mol) were prepared and submitted to 5, 10 or 15 extrusion cycles. Results show the hydrodynamic diameter d_H depends on the composition of the lipid bilayer and the number of extrusion cycles for 5 and 10% CHOL (mol) (Figure 2). Indeed, d_H increases as the percentage of CHOL increases for a given number of extrusion cycles, while d_H decreases as the number of extrusion cycles increases at a given percentage of CHOL. However, as previously reported (Semple *et al.*, 1996), the bilayer is so rigid for 30 mol% CHOL, that beyond a certain number of extrusion cycles, liposome size cannot be further reduced (Figure 2). For all conditions tested the PDI

remained satisfying below 0.2, ensuring thus a rather narrow size distribution. The advantage in terms of size reduction and polydispersity between 10 and 15 cycles being not obvious, we decided to fix the number of extrusion cycles to 10, yielding liposomes with a mean hydrodynamic diameter between 86 and 121 nm and a narrow size distribution ($PDI < 0.2$).

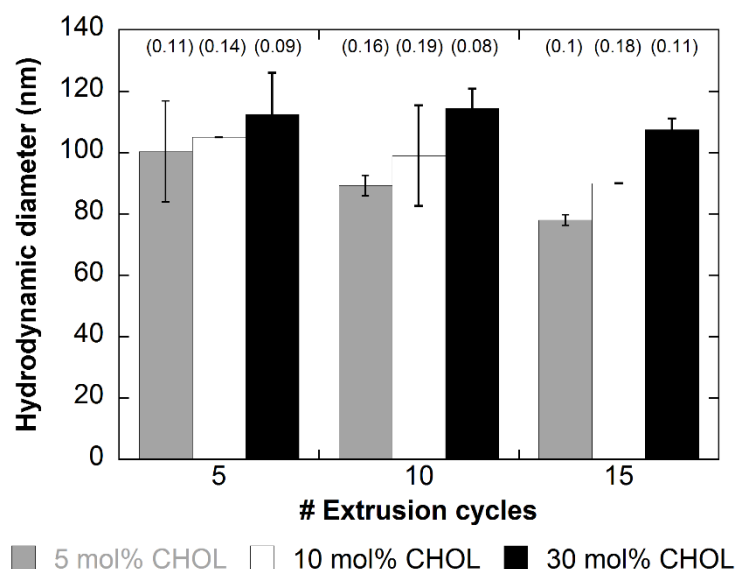


Figure 2. Liposomes size (nm) and polydispersity index (brackets) as a function of extrusion cycle number in presence of various CHOL mol% ($n = 3$).

3.2. DSC

DSC analysis was performed on liposomes prepared with increasing CHOL molar ratios (0, 5, 10, 15, 20 and 30%) to assess the effect of the CHOL insertion on the enthalpy of DPPC (Figure 3). CHOL-free liposomes (DPPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ 95:5 mol%) exhibit the typical pre-transition corresponding to the conversion of the lamellar gel phase $L_{\beta'}$ into the ripple gel phase $P_{\beta'}$ and the main transition related to the passage from the $P_{\beta'}$ phase to the lamellar liquid-crystalline phase L_{α} (Figure 3, inset) (Carion-Taravella *et al.*, 2002). The pre-transition occurs at T_{onset} 34.6°C with an enthalpy ΔH of 2.8 J/g of DPPC and the main phase transition at T_{onset} 41.9°C with an enthalpy of ΔH of 35.9 J/g of DPPC (Figure 4). The presence of both typical pre-transition and transition of DPPC reflects 5 mol% DSPE-PEG₂₀₀₀ does not affect drastically DPPC thermal properties. However, as previously reported, the DSPE-PEG₂₀₀₀ insertion within DPPC bilayer results in lower enthalpy than that is usually reported for pure DPPC bilayer (around 40 J/g) (Carion-Taravella *et al.*, 2002). Above 5 mol% CHOL, the pre-transition is abolished, proving thus CHOL insertion within the bilayer. In addition, as CHOL molar % increases between 5 and 20 mol%, T_{onset} of the main transition is slightly shifted down to about

41°C, and the enthalpy decreases down to 8.3 J/g of DPPC for 20 mol% CHOL (Figure 4). At 30 mol% CHOL, no thermal event can be detected supporting that DPPC phase transition is fully abolished (Figure 4). These results suggest that CHOL insertion within DPPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (5 mol%) bilayers allow to finely tune the temperature sensitivity of liposome formulations.

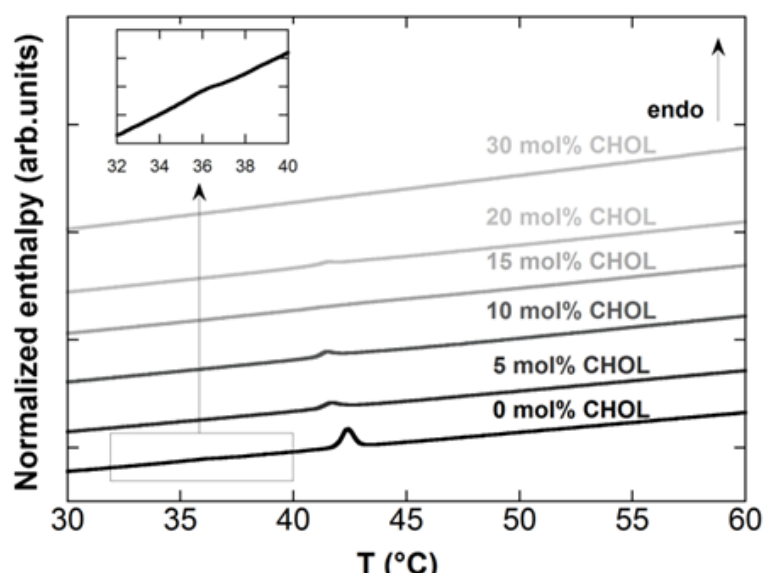


Figure 3. DSC thermograms obtained from liposomes made of DPPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ upon heating at 5°C/min according to CHOL mol%.

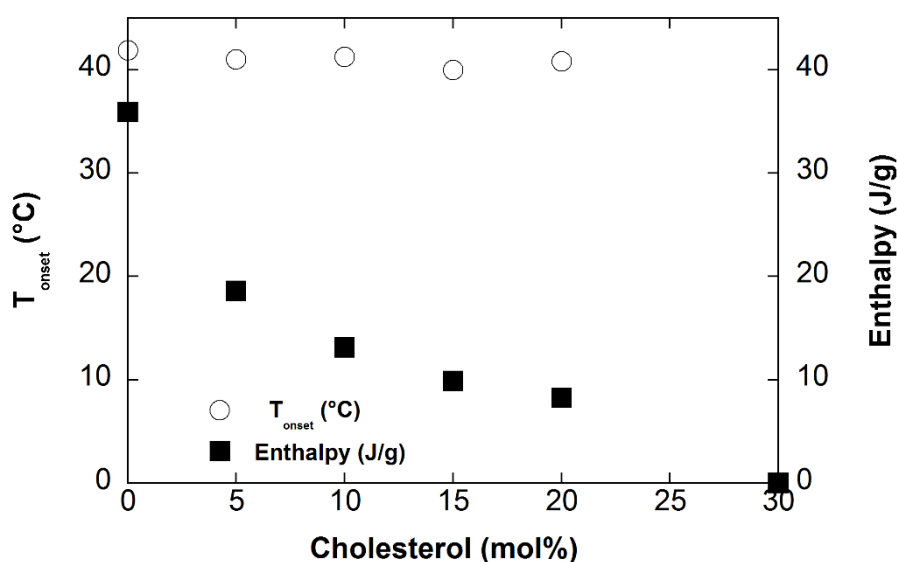


Figure 4. T_{onset} and corresponding normalized enthalpy obtained from liposomes upon heating at 5°C/min according to CHOL mol%.

3.3. Calcein leakage from liposomes

To assess the temperature sensitivity of liposomes, a calcein solution was encapsulated at 40 mM (*i.e.*, above its self-quenching concentration of 15 μ M) into liposomes containing a concentration range of CHOL (0 to 30 mol% CHOL) (Supplementary Data, Figure S1), and calcein release upon water-bath induced hyperthermia was monitored using spectrofluorimetry. Before heating, a residual fluorescence signal F_0 was measured arising from free calcein. Therefore, the released percentage measured only arises from additional calcein release (Figure 5). At 25°C and 37°C, none of formulations exhibits substantial calcein release. At 42°C, liposomes prepared with 0, 5, 10 and 15 mol% CHOL released 32, 38, 53, and 49% of the encapsulated calcein, respectively. No calcein release from liposomes containing 30 mol% CHOL was detected (< 0.5 %). In agreement with DSC experiments, these results show that liposomal formulations containing from 0 to 15% CHOL are considered as temperature-sensitive whereas the liposomes with 30 mol% CHOL are non-temperature-sensitive.

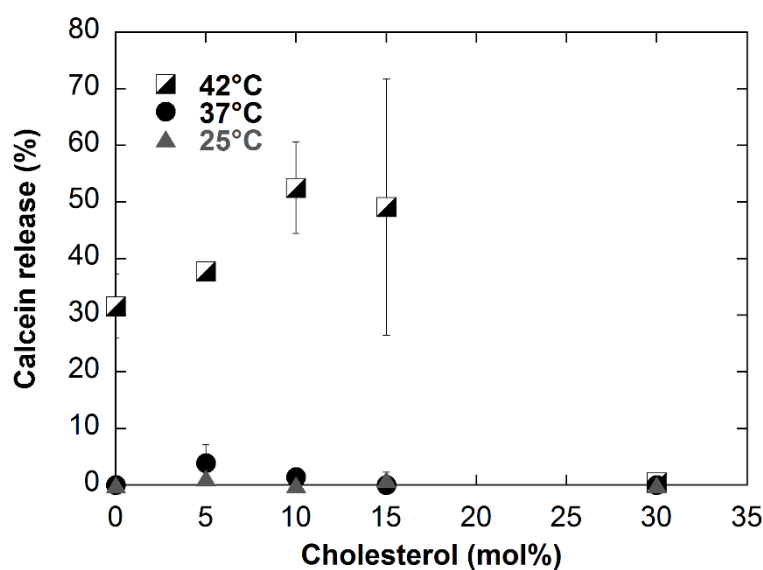


Figure 5. Release profile of encapsulated calcein from the different liposomal systems according to CHOL mol% and heating temperature for 5 min (n = 3) using a water-bath.

3.4. Ultrasound-induced hyperthermia

The temperature increment was measured in the sample holder as a function of the ultrasound parameters over time. The interest of the glycerol-filled cuvette is demonstrated in Figure 6A. For these acoustic parameters (PNP: 1.75 MPa, number of cycles: 400, PRF: 1 kHz), the use of the glycerol-filled cuvette allows a significant temperature increment in the sample holder of 9°C compared to water. In Figure 6B, curves are displayed as a function of the acoustic pressure for 400 cycles and 1 kHz PRF. For each pressure, a quick increase in temperature occurs within

the first two minutes of ultrasound exposure. After 5 minutes insonation, the temperature inside the sample holder is quasi-stabilized. At 2 MPa, the maximal temperature at the focus is 49.8°C after 10 minutes insonation. The maximal temperature drops when the PNP decreases. Using 400 cycles and 1 kHz PRF, a PNP higher than 1 MPa is required to reach the phase transition temperature of 41°C allowing the calcein release from TSLs. Furthermore, a PNP of 1.25 MPa would be too weak to induce a temperature increment higher than 41°C in an adequate volume because of the size of the focal spot. As shown in Figure 6C, a similar trend is observed for temperature increment as a function of the number of cycles (for 1.75 MPa PNP, 1 kHz PRF). In these conditions, increasing the pulse length by 100 cycles (Figure 6C) is equivalent to increase the PNP by 0.25 MPa (Figure 6B). Indeed, the same maximal temperature of 49.8°C is reached by transmitting (i) 2 MPa PNP, 400 cycles, 1 kHz PRF, 10 min insonation or (ii) 1.75 MPa PNP, 500 cycles, 1 kHz PRF, 10 min insonation. For both ultrasound parameters, the root mean square power transmitted to the transducer is exactly the same (4.5 W)

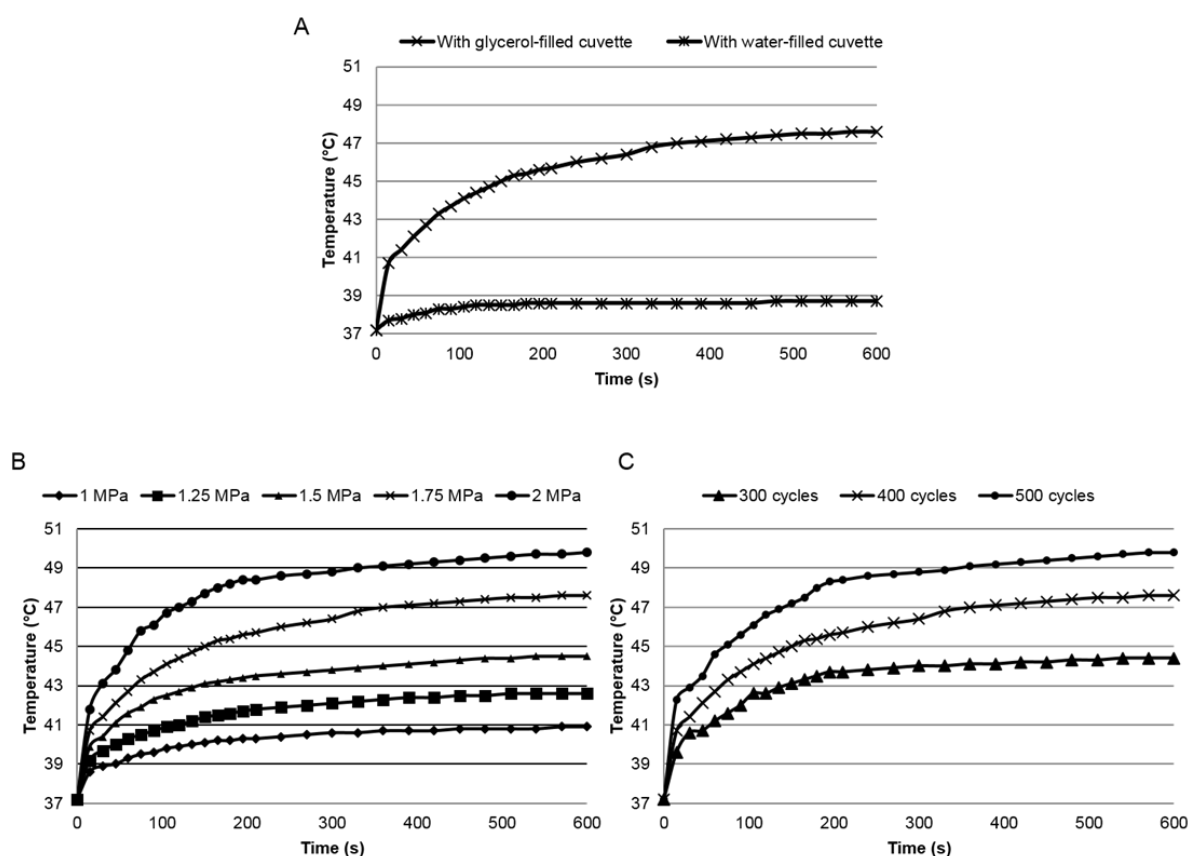


Figure 6. (A) Comparison of the temperature increment induced by FUS (1.75 MPa, 400 cycles, 1 kHz PRF) using glycerol-filled or water-filled cuvettes. Panels B and C show time-temperature curves as a function of the acoustic parameters using the glycerol-filled cuvette. Results are displayed as a function of the peak-negative pressure (400 cycles, 1 kHz PRF) in panel (B) and the number of cycles (1.75 MPa, 1 kHz PRF) in panel (C).

3.5. *In vitro* calcein release

To assess the role of thermal effect on the calcein release from TSLs and NTSLs, the liposome samples are heated between 37°C and 49°C in water-bath for 10 minutes (Figure 7A). As expected, no temperature-dependent calcein release from NTSLs is observed. For TSLs, the calcein release increases linearly between 37°C and 42°C and reaches a plateau for temperature above 42°C. Even at 49°C, the thermally-induced calcein release never exceeds 45% for this liposomal formulation. Most of the calcein (*i.e.*, 55%) is still trapped inside liposomes in the minutes following the heating.

As shown in Figure 7B, TSLs and NTSLs are exposed to acoustic pressures ranging from 1 MPa to 2 MPa (400 cycles, 1 kHz PRF) for 10 minutes. For TSLs, a weak calcein release is detected for pressure amplitudes from 1 to 1.25 MPa (*i.e.*, < 15%). In these conditions, the temperature inside the whole sample holder is not sufficient (Figure 6B) to induce a significant release. At 1.5 MPa, the calcein release is 47%, a value close to the maximal leakage obtained after water-bath heating. Above this pressure, the calcein release continues to slightly increase and reaches 57% at 2 MPa. For NTSLs, no calcein release (< 2%) is detected for pressure amplitudes below 1.5 MPa whereas it increases to 6% and 11% at 1.75 MPa and 2 MPa, respectively.

Kinetics of FUS-mediated (1.75 MPa, 400 cycles, 1 kHz PRF) calcein release from TSLs and NTSLs are compared to the release induced by a water-bath heating at 42°C (Figure 8). The FUS parameters were specifically selected to observe an additional calcein release compared to water-bath heating (Figure 7B) over time. Water-bath heating resulted in a quick calcein release from TSLs during the first five minutes before reaching a plateau. In agreement with the previous results (Figure 7A), no calcein release from NTSLs is detected over time. The exposure of TSLs to FUS induced a progressive calcein release during the first ten minutes. This delay corresponds to the time necessary for heating the sample holder containing liposomes by FUS. However, a slow additional release up to 62% is observed after 30 minutes. The exposure of NTSLs to FUS heating induced a gradual calcein release reaching 14% after 30 minutes insonation. Thirty minutes later, FUS-mediated release is 15% and 13% higher than water-bath heating for TSLs and NTSLs, respectively.

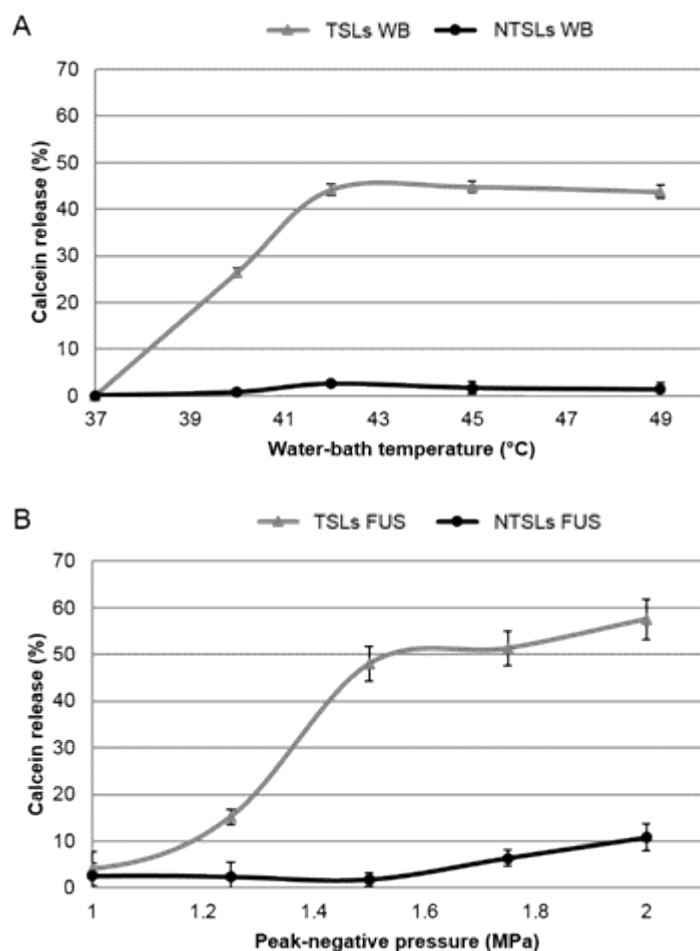


Figure 7. Temperature dependence of calcein release from liposomes after 10 min water-bath (WB) heating (A). Results after FUS exposure are displayed as a function of acoustic pressure in panel B for 400 cycles, repetition of 1 kHz and 10 min insonation (n = 3).

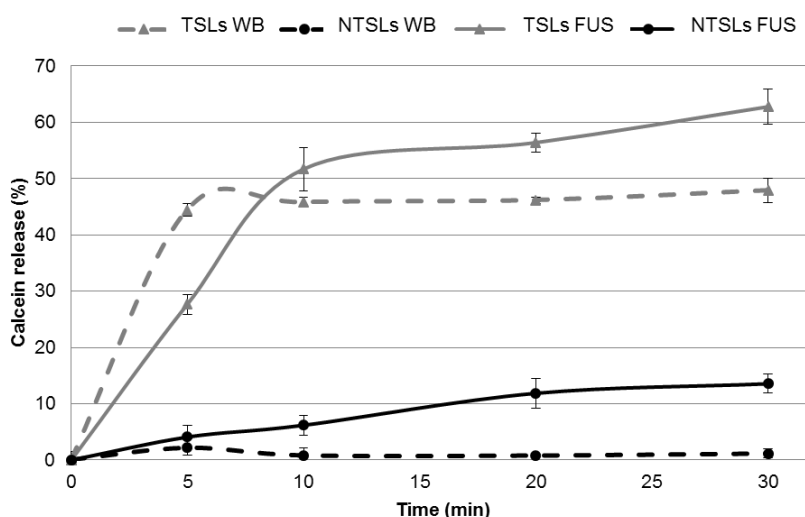


Figure 8. Calcein release from liposomes as a function of the exposure duration for water-bath (WB) and FUS heating (n = 3).

3.6. Influence of the thermal effect on the size of liposomes

To investigate the influence of both thermal and non-thermal effects on the size of liposomes, cryo-TEM experiments are performed on TSLs heated in water-bath at 37°C (Figure 9A) and 42°C (Figure 9B) during 10 minutes, and on TSLs exposed to FUS (400 cycles, 1kHz PRF, 10 minutes) for acoustic pressures of 1 MPa (Figure 9C) and 2 MPa (Figure 9D). For each experimental condition, the diameter of one hundred liposomes is measured and reported in Figure 10 for TSLs and NTSLs. The mean diameter of NTSLs is larger than TSLs because of CHOL addition within the NTSLs bilayer, as mentioned above (Figure 10). Furthermore, no significant difference in NTSLs size is detected ($p > 0.05$) for the different heating conditions. As shown in Figure 10, water-bath heating at 42°C or FUS exposure at 2 MPa induces significant decrease in TSLs diameter (*i.e.*, 14%) compared to water-bath heating at 37°C. At 1 MPa, no significant difference in liposome diameter ($p > 0.05$) is noticed. In agreement with previous data (Figures 6B and 7B), this result shows that the FUS-induced temperature increment was not sufficient to induce a calcein release at this acoustic pressure.

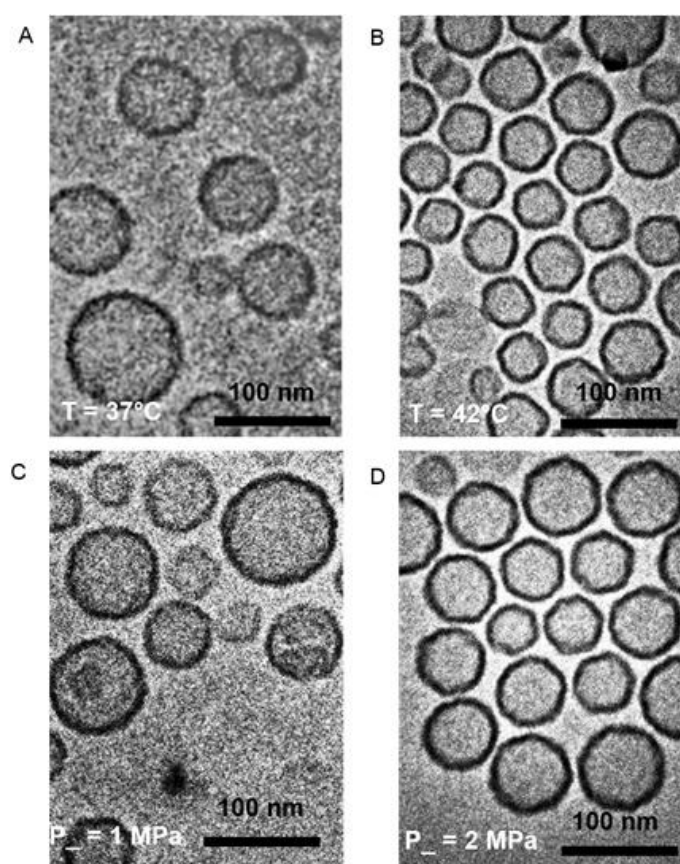


Figure 9. Cryo-TEM images of TSLs after 10 minutes heating in a water bath at 37°C (A) and at 42°C (B). Images of TSLs after FUS exposure (400 cycles, 1 kHz PRF, exposure time 10 min) at 1 MPa and at 2 MPa are displayed in panels C and D, respectively. Scale bar, 100 nm.

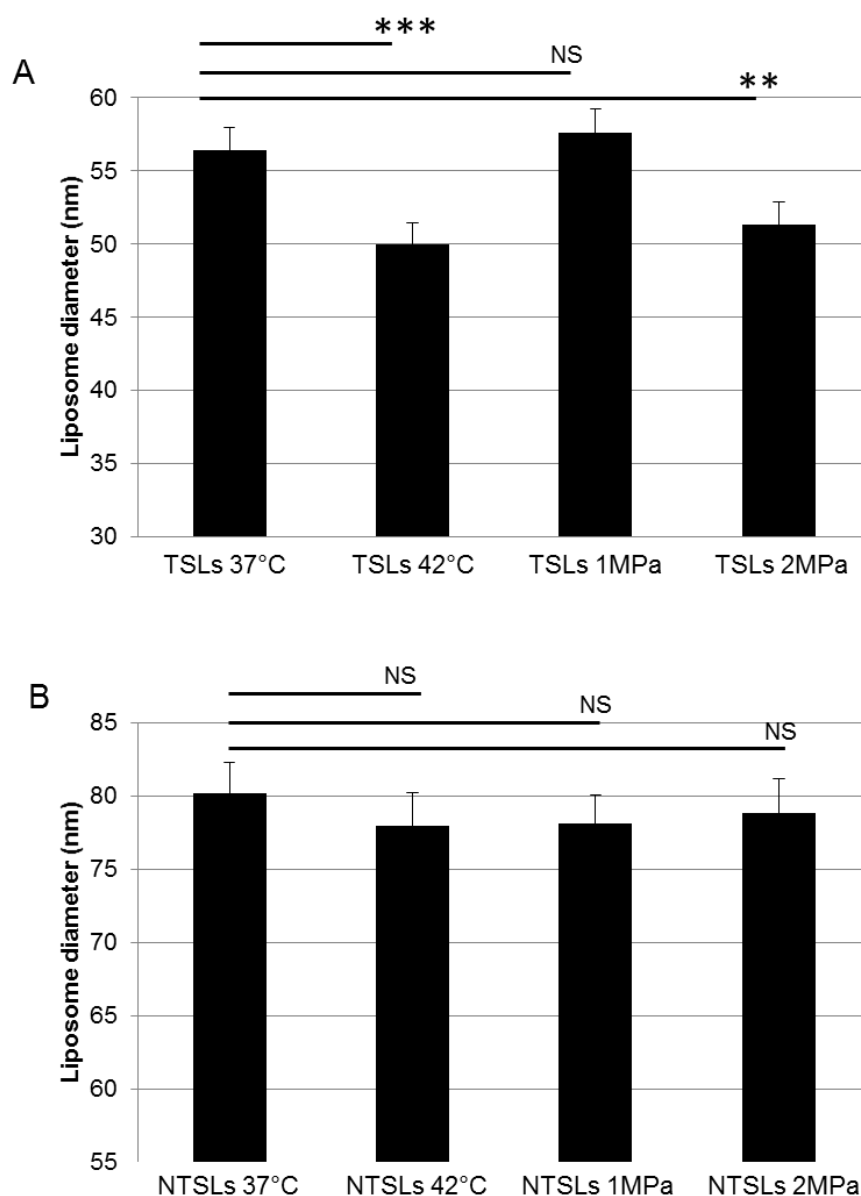


Figure 10. Mean diameters of TSLs (A) and NTSLs (B) exposed to different water-bath and FUS heating during 10 min (n = 100 liposomes). Statistical analysis was performed using the nonparametric experiments Mann-Whitney test. Significance was defined as $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS, non significant).

4. Discussion

Over the last decades, FUS has emerged as a versatile technology for non-invasive thermal therapies in oncology (Dromi *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2008). The ultrasound waves are attenuated as they pass through tissue owing to scattering and absorption of the acoustic energy. Some amount of energy absorbed is converted into heat (*i.e.*, thermal effect) (Fry *et al.*, 1950). This amount depends on the ultrasound parameters and the tissue exposed. From ultrasound

side, acoustic parameters (*i.e.*, amplitude, length and frequency) of the propagating wave, the tissue volume heated and exposure time influence the hyperthermia efficacy. The heating of tissue depends on their molecular composition, thermal conduction (*i.e.*, absorption coefficient) and blood perfusion. However, the ultrasound/tissue interaction can induce other biophysical effects such as radiation force or cavitation (*i.e.*, mechanical effects) (Deckers and Moonen, 2010). In this *in vitro* study, the contribution of thermal and mechanical effects in the FUS-triggered drug release from TSLs was explored.

To only assess the role of thermal effect, liposomes were first incubated in a water-bath at temperatures ranging between 37°C and 49°C. In agreements with previous studies (Han *et al.*, 2005), temperature increment from 37°C to 42°C results in gradual increase in calcein release from TSLs reaching a plateau at 42°C with a maximal release rate of 45% (Figure 7A). As expected, no calcein release from NTLs is detected. From FUS side, an acoustic pressure of 1.5 MPa PNP induces a calcein release from TSLs as efficient as water-bath heating (Figure 7). In addition, no calcein release from NTSLs is observed under such acoustic pressures. These results suggest that thermal effects might play a major role in the calcein release from TSLs under an acoustic pressure below 1.5 MPa. However, the exposure of TSLs to acoustic pressures above 1.5 MPa (*i.e.*, 1.75 MPa and 2 MPa) results in an additional calcein release (up to 12%). Under such higher pressures, similar calcein release trend from NTSLs was observed (up to 11%). As previously reported (Afadzi *et al.*, 2012), these results support the hypothesis that acoustic pressures above 1.5 MPa induce mechanical effects, which disrupt the liposomal membrane of both TSLs and NTSLs leading thus to an additional calcein release in the medium. This supplementary release increases with the ultrasound beam energy and the total exposure time.

Acoustic cavitation and radiation forces are two main mechanical effects induced by high energy FUS. Acoustic cavitation is defined as the formation and the activity of gas bubbles in a medium exposed to ultrasound (Apfel, 1982). The sustained growth of cavitation bubbles and their oscillations over several acoustic cycles is known as stable cavitation (Deckers *et al.*, 2010). Exposure to high intensity pulsed waves can lead to inertial cavitation, corresponding to a violent bubble radial expansion and immediate collapse (Yudina *et al.*, 2012). Recently, Ninomiya *et al.* reported that the collapse of cavitation bubbles leads to an increase in the local temperature, enhancing thus the drug release from TSLs (Ninomiya *et al.*, 2014). In addition, NTSLs show a good stability at high temperature. However, as previously suggested (Ninomiya *et al.*, 2014), the collapse of cavitating bubbles or their oscillations near liposomes could induce a local mechanical stress resulting in the destabilization of the liposomal membrane, enhancing

thus its permeability and the drug release. Indeed, Schroeder *et al.*, report that the exposure of liposomes to an oscillating ultrasonic field induces the formation of gas bubble nuclei in the hydrophobic region of the liposomal bilayer (Schroeder *et al.*, 2009). These nuclei grow until they permeate the membrane through the formation of transient hydrophilic pores resulting in the drug release. After ultrasound exposure, the liposomal membrane resumes its initial impermeable state. Nowadays, this mechanism is not clearly understood and further investigation is still necessary.

With HIFU, radiation forces can result in the local particle displacements and fluid currents also as known as acoustic streaming (Sarvazyan *et al.*, 2010). Acoustic streaming may involve (i) bulk streaming, which produces fluid currents, responsible of particle movements in the direction of the propagating ultrasound wave and (ii) micro-streaming wherein local currents are created near cavitating bodies. As recently described, micro-streaming can also induce shear stresses that destabilize the liposome bilayer thus releasing the encapsulated drug. Indeed, Oerlemans *et al.*, loaded hydrophilic (*i.e.*, fluorescein) and hydrophobic (*i.e.*, Nile Red) fluorescent dyes into NTLs and TSLs and measured the release kinetics under HIFU (Oerlemans *et al.*, 2013). Interestingly, the authors did not observe Nile Red release from both TSLs and NTLs when they were exposed to increased temperature above the lipid T_m in water-bath. Nevertheless, the HIFU exposure of both liposome formulations induced Nile Red release. In this case, the observed release was attributed to non-cavitational and non-thermal effects of HIFU. The authors speculated that radiation force-mediated streaming induced collisions of liposomes during HIFU exposure could be responsible for the release of Nile Red from the liposome bilayer.

Cryo-TEM observations support this conclusion. Indeed, the incubation of liposomes to temperature increment above their T_m in water-bath induces slight but significant diminution of the mean TSLs diameter (*i.e.*, 14%) while the NTLs size remains unchanged. Similar diminution of the mean TSLs diameter is observed after their exposure to acoustic pressures inducing temperature elevation above their T_m . This decrease in TSLs size is the specific signature of thermal effect (Leirer *et al.*, 2009). Indeed, Leirer *et al.*, reported that at temperature above their T_m , TSLs exhibit budding or pearl formation. These buds remain connected to the parent liposomes presumably by small neck. Cooling these TSLs at temperature below their T_m leads to complete rupture and fission of the neck, while the parent liposome remains intact with decreased size. Although both thermal and non-thermal effects (*i.e.*, mechanical effects) are responsible for the calcein release from TSLs (Figures 7 and 8) at high acoustic pressures (*i.e.*, above 1.5 MPa), the non-thermal effects do not influence the liposome size. Indeed, when

exposed to an acoustic pressure of 2 MPa, the decrease in TSLs size is similar to that induced by thermal effect only (*i.e.*, water-bath at 42°C). Moreover, increasing the acoustic pressure does not influence the mean NTSLs diameter. According to previous studies (Schroeder *et al.*, 2007), these results indicated that the liposome diameter remained unaffected by the non-thermal effect induced by high acoustic pressures. Indeed, Shroeder *et al.* suggested that FUS-mediated mechanical effects induced the release of encapsulated compound through the formation of transient pores in the liposome membrane (Schroeder *et al.*, 2009) without any change in liposome size distribution (Schroeder *et al.*, 2007).

Compared to other *in vitro* studies using a setup based on a water-filled tank (Afadzi *et al.*, 2012; Oerlemans *et al.*, 2013; Ninomiya *et al.*, 2014), our *in vitro* setup approaches the *in vivo* scenario (Mannaris *et al.*, 2013) and requires much lower ultrasound energy to induce a significant temperature increment (Figure 6A). Indeed, because of the high-energy absorption in tissue, ultrasonic energy inducing the desired temperature elevation *in vivo* is usually lower than the energy required *in vitro* (Patel *et al.*, 2008). Therefore, the use of higher ultrasonic energy *in vitro* leads to an overestimation of the role of the mechanical effects *in vivo*.

Based on our results, it is shown that mechanical effects are cumulated to thermal effect. For example, FUS-triggered release from TSLs is equal to the addition of thermal effect (*i.e.*, TSLs incubated in water-bath at 42°C) with non-thermal effects (*i.e.*, NTSLs exposed to the same FUS parameters). Although it is clearly demonstrated that FUS-mediated mechanical effects plays a role in the drug release, our findings suggest that the thermal effect is the prevailing mechanism inducing calcein release from TSLs when exposed to FUS. Nevertheless, the contribution of mechanical effects on liposomes could be exploited in further investigations, in order to increase the drug release from TSLs by transmitting higher FUS energy.

We should mention that the role of mechanical stresses on drug release depends on the liposome formulation and/or the entrapped drug. Indeed, in a previous study using doxorubicin-loaded TSLs, no extra release induced by FUS was detected using the same *in vitro* setup and FUS parameters. The major difference in the liposomal formulation is the addition of hydrogenated-L- α -phosphatidylcholine (HSPC) in the doxorubicin-loaded TSLs.

5. Conclusions

In summary, our results suggest that, in addition to the thermal effect, FUS generates a mechanical stress on the liposomes enhancing the calcein release by up to 12% for high acoustic pressures. Indeed, for high acoustic pressures, FUS-induced calcein release is higher than after

the incubation of liposomes in a water-bath. Cryo-electron microscopy observations demonstrate that thermal effect results in a decrease of the liposome diameter whereas mechanical stress does not alter the liposome size. This observation supports the hypothesis that FUS-mediated mechanical effects induced the formation of transient pores in the liposome membrane. Further research is necessary to clearly understand which mechanical effects are involved in drug release and how the mechanical stress affects the liposome membrane.

Acknowledgements

The authors thank Drs. M. Averkiou and C. Mannaris (University of Cyprus, Nicosia, Cyprus) for providing FUS transducer, Dr. S. Attucci (Inserm U-1100, Tours, France) for her technical assistance in spectrofluorimetry.

Declaration of interest statement

This research work was funded by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-10-TecSan-007), the European Commission FP7 Program SONODRUGS (NMP4-LA-2008-213706) and FEDER PRESAGE (3431 – 35438). Institut Galien Paris-Sud is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

Supplementary figure

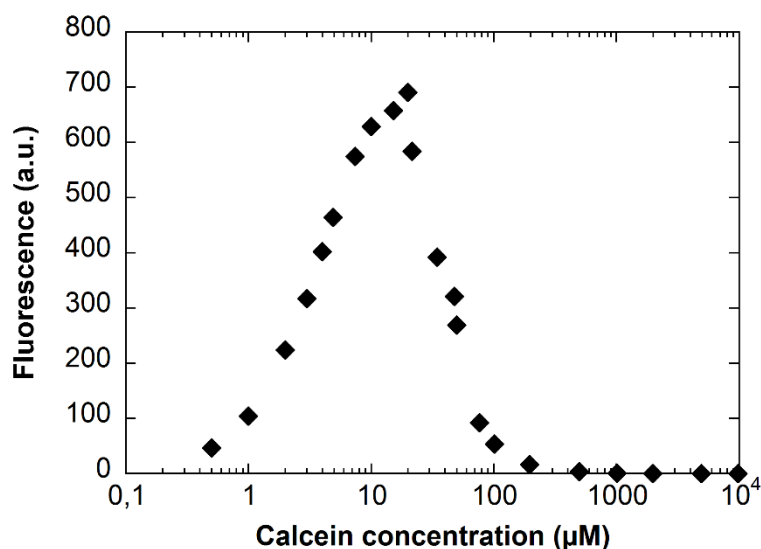


Figure S1. Calcein fluorescence intensity as a function of calcein concentration.

Références

- Afadzi, M., Davies Cde, L., Hansen, Y. H., Johansen, T., Standal, O. K., Hansen, R., Masoy, S. E., Nilssen, E. A. and Angelsen, B. (2012). "Effect of ultrasound parameters on the release of liposomal calcein." Ultrasound in Medicine and Biology **38**(3): 476-486.
- Al-Ahmady, Z. S., Al-Jamal, W. T., Bossche, J. V., Bui, T. T., Drake, A. F., Mason, A. J. and Kostarelos, K. (2012). "Lipid-peptide vesicle nanoscale hybrids for triggered drug release by mild hyperthermia in vitro and in vivo." ACS Nano **6**(10): 9335-9346.
- Al-Jamal, W. T., Al-Ahmady, Z. S. and Kostarelos, K. (2012). "Pharmacokinetics & tissue distribution of temperature-sensitive liposomal doxorubicin in tumor-bearing mice triggered with mild hyperthermia." Biomaterials **33**(18): 4608-4617.
- Apfel, R. E. (1982). "Acoustic cavitation: a possible consequence of biomedical uses of ultrasound." British Journal of Cancer. Supplement **5**: 140-146.
- Barenholz, Y. (2012). "Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned." Journal of Controlled Release **160**(2): 117-134.
- Blanco, E., Hsiao, A., Mann, A. P., Landry, M. G., Meric-Bernstam, F. and Ferrari, M. (2011). "Nanomedicine in cancer therapy: Innovative trends and prospects." Cancer Science **102**(7): 1247-1252.
- Carion-Taravella, B., Lesieur, S., Chopineau, J., Lesieur, P. and Ollivon, M. (2002). "Phase behavior of mixed aqueous dispersions of dipalmitoylphosphatidylcholine and dodecyl glycosides: A differential scanning calorimetry and X-ray diffraction investigation." Langmuir **18**(2): 325-335.
- Chen, D. and Wu, J. (2010). "An in vitro feasibility study of controlled drug release from encapsulated nanometer liposomes using high intensity focused ultrasound." Ultrasonics **50**(8): 744-749.
- de Smet, M., Heijman, E., Langereis, S., Hijnen, N. M. and Grull, H. (2011). "Magnetic resonance imaging of high intensity focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: an in vivo proof-of-concept study." Journal of Controlled Release **150**(1): 102-110.
- de Smet, M., Langereis, S., van den Bosch, S. and Grull, H. (2010). "Temperature-sensitive liposomes for doxorubicin delivery under MRI guidance." Journal of Controlled Release **143**(1): 120-127.
- Deckers, R. and Moonen, C. T. (2010). "Ultrasound triggered, image guided, local drug delivery." Journal of Controlled Release **148**(1): 25-33.
- Dromi, S., Frenkel, V., Luk, A., Traugher, B., Angstadt, M., Bur, M., Poff, J., Xie, J., Libutti, S. K., Li, K. C. P. and Wood, B. J. (2007). "Pulsed-High Intensity Focused Ultrasound and Low Temperature-Sensitive Liposomes for Enhanced Targeted Drug Delivery and Antitumor Effect." Clinical Cancer Research **13**(9): 2722-2727.

- Escoffre, J. M., Novell, A., de Smet, M. and Bouakaz, A. (2013). "Focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: in-vitro characterization and validation." Physics in Medicine and Biology **58**(22): 8135-8151.
- Evjen, T. J., Hagtvet, E., Moussatov, A., Rognvaldsson, S., Mestas, J. L., Fowler, R. A., Lafon, C. and Nilssen, E. A. (2013). "In vivo monitoring of liposomal release in tumours following ultrasound stimulation." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **84**(3): 526-531.
- Frenkel, V., Etherington, A., Greene, M., Quijano, J., Xie, J., Hunter, F., Dromi, S. and Li, K. C. (2006). "Delivery of liposomal doxorubicin (Doxil) in a breast cancer tumor model: investigation of potential enhancement by pulsed-high intensity focused ultrasound exposure." Academic Radiology **13**(4): 469-479.
- Fry, W. J., Wulff, V. J., Tucker, D. and Fry, F. J. (1950). "Physical Factors Involved in Ultrasonically Induced Changes in Living Systems: I. Identification of Non-Temperature Effects." Journal of Acoustical Society of America **22**(6): 867-876.
- Gaitanis, A. and Staal, S. (2010). "Liposomal doxorubicin and nab-paclitaxel: nanoparticle cancer chemotherapy in current clinical use." Methods in Molecular Biology **624**: 385-392.
- Ge, J., Neofytou, E., Cahill, T. J., 3rd, Beygui, R. E. and Zare, R. N. (2012). "Drug release from electric-field-responsive nanoparticles." ACS Nano **6**(1): 227-233.
- Gradishar, W. J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P., Hawkins, M. and O'Shaughnessy, J. (2005). "Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer." Journal of Clinical Oncology **23**(31): 7794-7803.
- Grüll, H. and Langereis, S. (2012). "Hyperthermia-triggered drug delivery from temperature-sensitive liposomes using MRI-guided high intensity focused ultrasound." Journal of Controlled Release **161**(2): 317-327.
- Han, H., Kim, T., Shin, B. and Choi, H. (2005). "Release of calcein from temperature-sensitive liposomes." Macromolecular Research **13**(1): 54-61.
- Hesley, G. K., Gorny, K. R. and Woodrum, D. A. (2013). "MR-guided focused ultrasound for the treatment of uterine fibroids." Cardiovascular and Interventional Radiology **36**(1): 5-13.
- Hossann, M., Wang, T., Wiggenhorn, M., Schmidt, R., Zengerle, A., Winter, G., Eibl, H., Peller, M., Reiser, M., Issels, R. D. and Lindner, L. H. (2010). "Size of thermosensitive liposomes influences content release." Journal of Controlled Release **147**(3): 436-443.
- Hynynen, K. (2011). "MRIGyFUFU: a tool for image-guided therapeutics." Journal of Magnetic Resonance Imaging **34**(3): 482-493.
- Jain, R. K. and Stylianopoulos, T. (2010). "Delivering nanomedicine to solid tumors." Nature Reviews Clinical Oncology **7**(11): 653-664.
- Khaibullina, A., Jang, B. S., Sun, H., Le, N., Yu, S., Frenkel, V., Carrasquillo, J. A., Pastan, I., Li, K. C. and Paik, C. H. (2008). "Pulsed high-intensity focused ultrasound enhances uptake of

radiolabeled monoclonal antibody to human epidermoid tumor in nude mice." Journal of Nuclear Medicine **49**(2): 295-302.

Kheirrolomoom, A., Lai, C.-Y., Tam, S. M., Mahakian, L. M., Ingham, E. S., Watson, K. D. and Ferrara, K. W. (2013). "Complete regression of local cancer using temperature-sensitive liposomes combined with ultrasound-mediated hyperthermia." Journal of Controlled Release **172**(1): 266-273.

Kong, G., Braun, R. D. and Dewhirst, M. W. (2001). "Characterization of the Effect of Hyperthermia on Nanoparticle Extravasation from Tumor Vasculature." Cancer Research **61**(7): 3027-3032.

Kong, G. and Dewhirst, M. W. (1999). "Hyperthermia and liposomes." International Journal of Hyperthermia **15**(5): 345-370.

Koning, G. A., Li, L. and ten Hagen, T. L. (2010). "Thermosensitive liposomes for the delivery of cancer therapeutics." Therapeutic Delivery **1**(5): 707-711.

Lafon, C., Somaglino, L., Bouchoux, G., Mari, J. M., Chesnais, S., Ngo, J., Mestas, J. L., Fossheim, S. L., Nilssen, E. A. and Chapelon, J. Y. (2012). "Feasibility study of cavitation-induced liposomal doxorubicin release in an AT2 Dunning rat tumor model." Journal of Drug Targeting **20**(8): 691-702.

Leirer, C., Wunderlich, B., Myles, V. M. and Schneider, M. F. (2009). "Phase transition induced fission in lipid vesicles." Biophysical Chemistry **143**(1-2): 106-109.

Li, L., ten Hagen, T. L. M., Schipper, D., Wijnberg, T. M., van Rhooon, G. C., Eggermont, A. M. M., Lindner, L. H. and Koning, G. A. (2010). "Triggered content release from optimized stealth thermosensitive liposomes using mild hyperthermia." Journal of Controlled Release **143**(2): 274-279.

Lim, J. M., Bertrand, N., Valencia, P. M., Rhee, M., Langer, R., Jon, S., Farokhzad, O. C. and Karnik, R. (2014). "Parallel microfluidic synthesis of size-tunable polymeric nanoparticles using 3D flow focusing towards in vivo study." Nanomedicine **10**(2): 401-409.

Mackay, J. A. and Chilkoti, A. (2008). "Temperature sensitive peptides: engineering hyperthermia-directed therapeutics." International Journal of Hyperthermia **24**(6): 483-495.

Mannaris, C., Efthymiou, E., Meyre, M.-E. and Averkiou, M. A. (2013). "In Vitro Localized Release of Thermosensitive Liposomes with Ultrasound-Induced Hyperthermia." Ultrasound in Medicine & Biology **39**(11): 2011-2020.

Matteucci, M. L., Anyambhatla, G., Rosner, G., Azuma, C., Fisher, P. E., Dewhirst, M. W., Needham, D. and Thrall, D. E. (2000). "Hyperthermia increases accumulation of technetium-99m-labeled liposomes in feline sarcomas." Clinical Cancer Research **6**(9): 3748-3755.

Napoli, A., Anzidei, M., De Nunzio, C., Cartocci, G., Panebianco, V., De Dominicis, C., Catalano, C., Petrucci, F. and Leonardo, C. (2013). "Real-time magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound focal therapy for localised prostate cancer: preliminary experience." European Urology **63**(2): 395-398.

- Needham, D., Anyarambhatla, G., Kong, G. and Dewhirst, M. W. (2000). "A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: Characterization and testing in a human tumor xenograft model." Cancer Research **60**(5): 1197-1201.
- Negussie, A. H., Yarmolenko, P. S., Partanen, A., Ranjan, A., Jacobs, G., Woods, D., Bryant, H., Thomasson, D., Dewhirst, M. W., Wood, B. J. and Dreher, M. R. (2011). "Formulation and characterisation of magnetic resonance imageable thermally sensitive liposomes for use with magnetic resonance-guided high intensity focused ultrasound." International Journal of Hyperthermia **27**(2): 140-155.
- Ninomiya, K., Kawabata, S., Tashita, H. and Shimizu, N. (2014). "Ultrasound-mediated drug delivery using liposomes modified with a thermosensitive polymer." Ultrasonics Sonochemistry **21**(1): 310-316.
- Novell, A., Escoffre, J. M., Al-Sabbagh, C., Mannaris, C., Fattal, E., Tsapis, N., Averkiou, M. and Bouakaz, A. (2012). Role of thermal and mechanical effects on drug release from thermosensitive nanocarriers. Ultrasonics Symposium (IUS), 2012 IEEE International.
- Oerlemans, C., Deckers, R., Storm, G., Hennink, W. E. and Nijssen, J. F. W. (2013). "Evidence for a new mechanism behind HIFU-triggered release from liposomes." Journal of Controlled Release **168**(3): 327-333.
- Park, S. M., Kim, M. S., Park, S.-J., Park, E. S., Choi, K.-S., Kim, Y.-s. and Kim, H. R. (2013). "Novel temperature-triggered liposome with high stability: Formulation, in vitro evaluation, and in vivo study combined with high-intensity focused ultrasound (HIFU)." Journal of Controlled Release **170**(3): 373-379.
- Patel, P. R., Luk, A., Durrani, A., Dromi, S., Cuesta, J., Angstadt, M., Dreher, M. R., Wood, B. J. and Frenkel, V. (2008). "In vitro and in vivo evaluations of increased effective beam width for heat deposition using a split focus high intensity ultrasound (HIFU) transducer." International Journal of Hyperthermia **24**(7): 537-549.
- Ranjan, A., Jacobs, G. C., Woods, D. L., Negussie, A. H., Partanen, A., Yarmolenko, P. S., Gacchina, C. E., Sharma, K. V., Frenkel, V., Wood, B. J. and Dreher, M. R. (2012). "Image-guided drug delivery with magnetic resonance guided high intensity focused ultrasound and temperature sensitive liposomes in a rabbit Vx2 tumor model." Journal of Controlled Release **158**(3): 487-494.
- Sarvazyan, A. P., Rudenko, O. V. and Nyborg, W. L. (2010). "Biomedical applications of radiation force of ultrasound: historical roots and physical basis." Ultrasound in Medicine and Biology **36**(9): 1379-1394.
- Schroeder, A., Avnir, Y., Weisman, S., Najajreh, Y., Gabizon, A., Talmon, Y., Kost, J. and Barenholz, Y. (2007). "Controlling Liposomal Drug Release with Low Frequency Ultrasound: Mechanism and Feasibility." Langmuir **23**(7): 4019-4025.
- Schroeder, A., Kost, J. and Barenholz, Y. (2009). "Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes." Chemistry and Physics of Lipids **162**(1-2): 1-16.
- Semple, S. C., Chonn, A. and Cullis, P. R. (1996). "Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes." Biochemistry **35**(8): 2521-2525.

- Somaglino, L., Bouchoux, G., Mestas, J. L. and Lafon, C. (2011). "Validation of an acoustic cavitation dose with hydroxyl radical production generated by inertial cavitation in pulsed mode: application to in vitro drug release from liposomes." Ultrasonics Sonochemistry **18**(2): 577-588.
- Staruch, R. M., Ganguly, M., Tannock, I. F., Hynynen, K. and Chopra, R. (2012). "Enhanced drug delivery in rabbit VX2 tumours using thermosensitive liposomes and MRI-controlled focused ultrasound hyperthermia." International Journal of Hyperthermia **28**(8): 776-787.
- Wang, A. Z., Langer, R. and Farokhzad, O. C. (2012). "Nanoparticle delivery of cancer drugs." Annual Review of Medicine **63**: 185-198.
- Ward, J. F. (2011). "High-intensity focused ultrasound for therapeutic tissue ablation in surgical oncology." Surgical Oncology Clinics of North America **20**(2): 389-407, ix.
- Yan, Y., Such, G. K., Johnston, A. P., Best, J. P. and Caruso, F. (2012). "Engineering particles for therapeutic delivery: prospects and challenges." ACS Nano **6**(5): 3663-3669.
- Yatvin, M. B., Weinstein, J. N., Dennis, W. H. and Blumenthal, R. (1978). "Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia." Science **202**(4374): 1290-1293.
- Yu, Y., Chen, C. K., Law, W. C., Weinheimer, E., Sengupta, S., Prasad, P. N. and Cheng, C. (2014). "Polylactide-graft-doxorubicin nanoparticles with precisely controlled drug loading for pH-triggered drug delivery." Biomacromolecules **15**(2): 524-532.
- Yudina, A., Lepetit-Coiffe, M., De Smet, M., Langereis, S., Grull, H. and Moonen, C. (2012). "In vivo temperature controlled ultrasound-mediated intracellular delivery of cell-impermeable compounds." Journal of Controlled Release **161**(1): 90-97.
- Zhang, H., Xia, H., Wang, J. and Li, Y. (2009). "High intensity focused ultrasound-responsive release behavior of PLA-b-PEG copolymer micelles." Journal of Controlled Release **139**(1): 31-39.

Chapitre 2

Optimisation de liposomes thermosensibles furtifs de 5-Fluorouracile pour la délivrance déclenchée par ultrasons

Chapitre 2 : Optimisation de liposomes thermosensibles furtifs de 5-Fluorouracile pour la délivrance déclenchée par ultrasons

Chantal Al Sabbagh^{1,2}, Anthony Novell³, Nicolas Tsapis^{1,2}, Jean-Michel Escoffre³, Ayache Bouakaz³,
Hélène Chacun^{1,2}, Stéphanie Denis^{1,2}, Juliette Vergnaud^{1,2}, Claire Gueutin^{1,2}, Elias Fattal^{1,2*}.

¹ Univ Paris-Sud, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

² CNRS UMR 8612, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

³ Université François-Rabelais de Tours, Inserm, Imagerie et Cerveau UMR U 930, Tours, France.

Etude soumise à publication dans Pharmaceutical Research

Résumé

Objectif : Nous avons optimisé l'encapsulation du 5-Fluorouracile (5-FU) dans des liposomes thermosensibles (LTS) furtifs en vue de déclencher sa libération en réponse à une hyperthermie (HT) induite par des ultrasons focalisés (FUS). La libération activée du 5-FU et la cytotoxicité vis-à-vis de la lignée cellulaire du carcinome colorectal HT-29 ont été étudiées.

Méthodes : Le 5-FU a été encapsulé dans des liposomes composés de 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DPPC)/cholestérol (CHOL)/1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine-N-PEG₂₀₀₀ (DSPE-PEG) sous forme libre par la méthode d'hydratation du film lipidique, ou, sous forme complexée avec le cuivre (Cu) et la polyéthylèneimine (PEI) par encapsulation active. La libération du 5-FU après exposition des LTS à une HT générée par un bain-marie ou des FUS a été mesurée. La cytotoxicité des LTS encapsulant le 5-FU a été évaluée sur une lignée cellulaire HT-29 en mesurant l'activité mitochondriale des cellules viables par le dosage MTS.

Résultats : Le 5-FU a été facilement encapsulé dans les liposomes en utilisant la méthode d'hydratation du film lipidique (efficacité d'encapsulation de 13%), mais très faiblement retenu après dilution des liposomes. La complexation du 5-FU avec le Cu-PEI s'est révélée efficace pour améliorer la rétention du 5-FU à l'intérieur des liposomes, et a permis d'obtenir des liposomes chargés de 5-FU à la concentration finale de 2,7 mg/ml (efficacité d'encapsulation de 37%). Au bout de 10 min, la libération du 5-FU déclenchée par une HT de 42°C à partir des LTS était de 63% en utilisant un bain-marie et de 68% en utilisant des FUS, alors qu'elle était inférieure à 20% pour les liposomes non thermosensibles. Le test MTS a révélé que la toxicité des liposomes encapsulant le 5-FU provient du 5-FU même et non pas des excipients. De plus, l'encapsulation du complexe 5-FU-Cu-PEI dans les LTS induit une diminution de la concentration inhibitrice médiane (CI₅₀) de 115 à 49 µM.

Conclusions : La complexation de 5-FU avec le complexe Cu-PEI semble une stratégie intéressante afin d'améliorer la rétention du 5-FU à l'intérieur des LTS. De plus, les LTS composés de DPPC/CHOL/DSPE-PEG permettent une libération efficace de leur contenu en réponse à une HT de 42°C au bout de 10 min, ce qui constitue un délai raisonnable pour les futures expériences *in vivo*.

5-Fluorouracil encapsulation into thermosensitive stealth[®] liposomes for triggered delivery

Chantal Al Sabbagh^{1,2}, Anthony Novell³, Nicolas Tsapis^{1,2}, Jean-Michel Escoffre³, Ayache Bouakaz³,
Hélène Chacun^{1,2}, Stéphanie Denis^{1,2}, Juliette Vergnaud^{1,2}, Claire Gueutin^{1,2}, Elias Fattal^{1,2*}.

¹ Univ Paris-Sud, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

² CNRS UMR 8612, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

³ Université François-Rabelais de Tours, Inserm, Imagerie et Cerveau UMR U 930, Tours, France.

Corresponding author: Prof Elias FATTAL

Elias.fattal@u-psud.fr

Phone: 33 1 46 83 55 68

Fax: 33 1 46 83 59 46

Abstract

Purpose: We optimize the encapsulation of 5-Fluorouracil (5-FU) into thermosensitive stealth[®] liposomes (TSLs) to trigger drug release upon hyperthermia using focused ultrasound (FUS).

Methods: 5-FU was encapsulated into liposomes made of 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine/cholesterol/1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-PEG₂₀₀₀ either as a free molecule or complexed with copper-polyethylenimine. Heat-triggered drug release was evaluated using either a water bath or FUS. Formulation cytotoxicity was assessed on HT-29 cell line by MTS assay.

Results: 5-FU was easily encapsulated using the lipid hydration method (encapsulation efficacy of 13%) but poorly retained upon dilution. 5-FU complexation with copper-polyethylenimine improved 5-FU retention into liposomes and allowed to obtain an encapsulation efficacy of 37%. At 42°C, heat-triggered 5-FU release from TSLs was 63% using a water bath and 68% using FUS, within 10 min, whereas it remained below 20% for the non-thermosensitive formulation. The MTS assay revealed that formulation toxicity arose from 5-FU and not from the excipients. In addition, 5-FU complex encapsulation into TSLs induces a reduction of the IC₅₀ from 115 down to 49 µM.

Conclusions: Complexation of 5-FU with copper-polyethylenimine appears an interesting strategy to improve 5-FU retention into TSLs. TSLs allow heat-triggered release of the drug within 10 min at 42°C, a reasonable time for future *in vivo* experiments.

Keywords: Thermosensitive stealth[®] liposomes; 5-Fluorouracil; Copper-polyethylenimine complex; Focused ultrasound.

1. Introduction

Liposomes with sizes below 1 micron have been extensively investigated as drug delivery carriers for anti-cancer chemotherapy. In particular, three anthracycline-loaded liposomes Myocet[®], Daunoxome[®], Doxil[®]/Caelyx[®] and anti-metabolite-loaded liposomes Depocyt[®] were approved by the FDA for tumor treatment. Many additional liposome-based anti-tumor nanomedicines are currently in clinical trials or in early- or late-stage preclinical development (Lammers *et al.*, 2012). Their development relies mainly on the enhanced permeation and retention effect (EPR effect) allowing the passive extravasation and intratumoral accumulation of nanomedicines in solid tumors (Lammers *et al.*, 2012; Maeda, 2012). Passive targeting of tumors however remains limited since the proportion of nanomedicines usually reaching the tumor site is below 10% of the injected dose (Maillard *et al.*, 2005). In addition, the extent of tumor vascularization and its porosity depend on the tumor type and its stage of development (Lammers *et al.*, 2012). Finally, although observed in the clinics, the EPR effect seems to be limited to certain patients (Crommelin and Florence, 2013) and other strategies should be considered to increase nanomedicine accumulation in solid tumors.

Among strategies to increase drug concentration in tumors, ultrasound-mediated drug delivery can be considered. The idea is to trigger drug release by application of ultrasound waves locally on the tumor as liposomes circulate to increase drug concentration in the tumor (Kong *et al.*, 2001). Ultrasound-mediated drug delivery can be triggered either by cavitation which leads to chemical disruption of the carrier (Novell *et al.*, 2012) or by mild hyperthermia (up to 42°C) on thermosensitive carriers (Mills and Needham, 2005; Needham *et al.*, 2013). Thermosensitive liposomes (TSLs) were first suggested by Yatvin *et al.* in the late 1970s (Yatvin *et al.*, 1978). Liposome thermosensitivity arises from the property of some lipids to possess a phase transition temperature (T_m) higher than physiological temperature. Above the phase transition temperature, lipids exhibit a conformational change leading to liposome rupture and release of the encapsulated drug. ThermoDox[®] (Celsion corporation), a temperature-sensitive PEGylated liposomal doxorubicin, is already in phase III for unresectable hepatocellular carcinoma, and in earlier phases of clinical trials for other tumor types (ClinicalTrials.gov; Identifier: NCT00617981).

Among anti-tumor molecules, 5-Fluorouracil (5-FU) remains for more than fifty years the most effective chemotherapeutic agent in the treatment of colorectal cancer and forms the central component in the FOLFIRI regimen in combination with irinotecan, and in the FOLFOX regimen in combination with oxaliplatin (El-Khoueiry and Lenz, 2006; Wilson *et al.*, 2010).

However, 5-FU suffers from several drawbacks: a short plasmatic half-life after intravenous bolus administration (11.4 min), drug clearance from plasma within 1 h as a consequence of a very rapid metabolism by the dihydropyrimidine dehydrogenase or uracil reductase enzymes (MacMillan *et al.*, 1978). In addition, 5-FU treatments lead to the development of drug resistance by tumor cells, thereby requiring high doses that lead to severe side effects, including gastrointestinal, haematological, neuronal and dermatological effects, pancytopenia, and cardiotoxicity (Okeda *et al.*, 1990). To overcome these limitations, 5-FU has been encapsulated into liposomes to prolong its circulation time, reduce the associated side effects, improve its therapeutic index and efficacy, and favor drug accumulation into tumors thanks to the enhanced permeation and retention effect (Ozer and Talsma, 1989; Fresta *et al.*, 1993; Glavas-Dodov *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2011; Pohlen *et al.*, 2012).

Our goal is to optimize the formulation of PEGylated TSLs encapsulating 5-FU. PEGylated lipids will confer stealth properties to the formulation, leading to a prolonged systemic circulation (Li *et al.*, 2010). As a thermosensitive lipid, we have chosen dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) because it exhibits a phase transition temperature T_m of $41.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Needham and Dewhirst, 2001), in the adequate range for thermosensitive formulations. Cholesterol (CHOL) was also included to promote *in vivo* stability (Gaber *et al.*, 1995; Semple *et al.*, 1996; Needham *et al.*, 2001). We have compared formulations encapsulating 5-FU either free or as a ternary complex with copper (II) and low molecular weight polyethylenimine (5-FU-CU-PEI). 5-FU release upon mild hyperthermia was performed using either a water bath or focused ultrasound (FUS). Finally, formulations toxicity on HT-29 colorectal carcinoma cells was evaluated. To the best of our knowledge, this work constitutes the first thermosensitive 5-FU formulation.

2. Materials and methods

2.1. Materials

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC, $T_m = 41.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$) was purchased from Genzyme (Liestal, Switzerland) and 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-PEG₂₀₀₀ (DSPE-PEG) from Avanti Polar Lipid Inc. (Alabaster, Alabama, USA). Cholesterol (CHOL), 5-Fluorouracil (5-FU, purity $\geq 99\%$), Copper (II) Acetate monohydrate (Cu), polyethylenimine, ethylenediamine branched (PEI, MW = 800 g/mol) and phosphate buffer saline (PBS) were obtained from Sigma (St Quentin-Fallavier, France). [2-¹⁴C]-5-FU was supplied by Moravek Biochemicals, Inc. (Brea, California, USA). Hionic-Fluor and Ultima Gold Scintillation fluids were purchased from Perkin Elmer (Perkin Elmer, Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Sephadex G-50 size exclusion gel was purchased from Pharmacia AB, Laboratory Separation Division (Upssala, Sweden). Solvents used, were of analytical grade. All chemical substances and solvents were used without further purification. Water was purified using a RIOS/Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France).

2.2. 5-FU liposomes

2.2.1. 5-FU-loaded liposomes preparation

Liposomes were composed of DPPC/CHOL/DSPE-PEG. Three liposomal formulations were produced: DPPC/CHOL/DSPE-PEG (95:0:5 mol%), DPPC/CHOL/DSPE-PEG (90:5:5 mol%) and DPPC/CHOL/DSPE-PEG (65:30:5 mol%). The molar percentage of DSPE-PEG was fixed at 5% since it has been shown that this ratio leads to satisfyingly stealth liposomes (Li *et al.*, 2010). Liposomes were prepared by the lipid hydration method followed by extrusion and ultracentrifugation to remove non-encapsulated compounds (Bangham *et al.*, 1965a). Briefly, lipid mixtures either of 0.12 mmol, 0.4 mmol or 0.8 mmol of total lipids, were dissolved into 10 mL of chloroform in either a 50 or 100 mL round-bottomed flask. The solvent was evaporated to dryness under reduced pressure for 40 min at 45°C to form a thin lipid film. Multilamellar liposomes were formed by hydration of the lipid film at 50°C with 10 mL of either 12 or 53.8 mM 5-FU solution (10 mM PBS, 138 mM NaCl, pH 7.4) to yield an initial drug to lipid ratio either of 12 mM:12 mM, or 12 mM:40 mM, or 53.8 mM:40 mM or 53.8 mM:80 mM. The resulting mixture was stirred vigorously followed by extrusion, ten times for 0 and 5 mol% CHOL or 6 times for 30 mol% CHOL, since this formulation is very long to extrude, or less depending on the lipid concentration. Extrusion was performed at 60°C, above the transition temperature of DPPC, under nitrogen pressure, between 508 and 871 psi depending on CHOL mol%, through a stack of two 100 nm polycarbonate filters (Isopore,

Millipore, Molsheim, France). Liposomes were stored at 4°C and characterization was carried out the day following preparation. Freshly prepared liposomes were centrifuged for 4 h at 4°C and 40,000 rpm (150,000g) in a Beckman ultracentrifuge (Optima LE-80K, Beckman Coulter, USA) in order to remove non-encapsulated 5-FU. Both supernatant and pellet were used for further studies.

2.2.2. HPLC determination of 5-FU

Analyses were performed on a Waters HPLC system, equipped with Waters 1525 Binary HPLC pump, sample injector Waters 717 plus autosampler and Waters 2487 dual λ absorbance detector. The column used was a Waters μ Bondapak®C18 (Guyancourt, France), reversed phase, 300 mm X 3.9 mm i.d., 10 μ m. The mobile phase consisted of 100% of 10 mM PBS. The pH was adjusted to 4.5 with perchloric acid. Chromatographic conditions were the following: Flow rate 1 mL/min, isocratic elution with column temperature maintained at 25°C, UV dual detection at 210 and 266 nm and an injection volume of 20 μ L. The Breeze program (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA) was used as acquisition and analysis software. All measurements were run in duplicate and mean values were reported. Results were calculated from a linear regression of 5-FU generated by dissolving known amounts of 5-FU in PBS, pH 4.5, in the concentration range of 0.15-30 μ g/mL.

5-FU was quantified in the pellet after solubilization in methanol, yielding the encapsulated 5-FU. Total 5-FU in the initial suspension was determined by solubilizing liposomes in methanol. In general, one volume of liposomes was solubilized with 9 volumes of methanol followed by tenth dilution with PBS. The effect of methanol concentration upon 5-FU peak was checked. The impact of the concomitant presence of lipid and 5-FU in samples was also determined by a calibration curve prepared by mixing 5-FU and solubilized liposomes. This was done in order to avoid matrix effects.

2.3. Determination of phospholipid concentration

The actual phospholipid concentration (DPPC and DSPE-PEG) after extrusion in the supernatant and in the total liposome suspension was determined using the Stewart assay for phospholipids where the ability of phospholipids to form a complex with ammonium ferrothiocyanate in organic solution is utilized. The resulting complex absorbs at 485 nm, thereby absorbance values were determined using a spectrometer (Lambda 25, UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer, USA) and translated into mmol of phospholipid according to a standard curve (Stewart, 1980). Pellet lipids were determined by subtraction and total lipid amount was extrapolated according to the molar ratios of each formula. The same method was applied for 5-Fu-Cu-PEI-loaded liposomes after purification as described below.

2.4. Determination of encapsulation efficacy and drug:lipid ratio

The concentrations of encapsulated 5-FU and total 5-FU in the suspension determined by HPLC were used to calculate the percentage of encapsulated 5-FU according to:

$$\% \text{ encapsulated 5-FU} = \frac{C_{\text{encapsulated}}}{C_{\text{total}}} \times 100$$

The drug:lipid ratio was calculated as mmol of encapsulated 5-FU/mmol lipid in the purified liposome determined by the Stewart method according to:

$$\text{drug:lipid} = \frac{\text{Encapsulated 5-FU (mmol)}}{\text{Lipid}_{\text{tot}} - \text{Lipid}_{\text{supernatant}} \text{ (mmol)}}$$

2.5. 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes

2.5.1. Copper and polyethylenimine concentrations optimization

In the presence of Cu ions, PEI forms a dark blue cuprammonium complex that exhibits two maxima absorption peaks at 285 nm and 630 nm, respectively (Ungaro *et al.*, 2003). On the one hand, to investigate the required concentrations of Cu and PEI for an optimal complexation, series solutions were prepared by varying Cu acetate concentrations within the range of 50-1500 mM in 10 mM PBS, the PEI concentration being constant at 1630 mM. These solutions were then appropriately diluted by 10 mM PBS. The complexation capacity was determined by recording the absorbance values at 285 nm. On the other hand, several complex solutions containing a fixed concentration of Cu acetate (600 mM) and increasing PEI amounts of 417 and 833 mM were tested to formulate liposomes as described above.

2.5.2. Cu-PEI hydration solution

The hydration solution was prepared by dissolving Cu acetate monohydrate by continuous stirring in PBS containing PEI at final concentrations of 417 mM (PEI) and 600 mM (Cu). The solution was heated at 60°C for 10 min and stored at room temperature until use. The osmolarity was measured using a micro-osmometer (Micro-osmometer Automatic Type 13 RS, Hermann Roebling MeBtechnik, Berlin, Germany).

2.5.3. 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes preparation

Two liposomal formulations were produced: DPPC/CHOL/DSPE-PEG (90:5:5 mol%) and DPPC/CHOL/DSPE-PEG (65:30:5 mol%). Liposomes were prepared as described previously. Briefly, lipid mixtures of 0.8 mmol of total lipids, were dissolved into 10 mL of chloroform in a 100 mL round-bottomed flask. After solvent evaporation, the thin lipid film was rehydrated at 50°C with 10 mL of Cu-PEI complex solution (600 mM-417 mM). Following hydration, liposomes were extruded ten times at 60°C as described above. Free complex was separated

from liposomes by exclusion-diffusion gel chromatography on a 1×30 cm Sephadex G-50 column pre-equilibrated with a 10 mM PBS (1776 mM dextrose, pH 7.4) and presaturated with empty liposomes. Liposomes were then reconcentrated using 0.5 mL Amicon Ultra centrifugal filters (cut-off 100 kDa, Millipore Corporation, Molsheim, France) for 80 min at 14,000g using a tabletop Eppendorf centrifuge 5418 (Hamburg, Germany) to yield liposome concentrates of 80 mM total lipids. Afterwards, reconcentrated liposomes at 80 mM were mixed with a 1665 mM dextrose solution containing 107.6 mM 5-FU (pH 7.4), spiked with ^{14}C -5-FU, at equal volumes to maintain the 5-FU:lipid ratio 53.8:40 mM:mM. Mixture was then distributed over eppendorfs and incubated at 30°C, 1000 rpm for different times (0 to 48 h). At various time points, samples were withdrawn from the oven and stored at 4°C until analysis.

2.5.4. 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes characterization

To study 5-FU active entrapment into liposomes by complexation with Cu-PEI complex, liposome suspensions were transferred into 0.5 mL Amicon Ultra centrifugal filters and spinned for 80 min at 14,000g, at 20°C using a Jouan centrifuge (MR22i, Thermo scientific, France). Subsequently, ultrafiltrates were collected and liposome concentrates were immediately recovered by reverse spinning for 2 min at 1,000g. Ultrafiltrates contained unencapsulated 5-FU whereas concentrates contained both of free and encapsulated 5-FU. Radioactivity of these separated fractions was measured using a scintillation counter (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, Beckman Coulter, USA) and the encapsulated 5-FU concentration was calculated according to the following equation:

$$C_{\text{encapsulated 5-FU}} = (C_{\text{total}} - C_{\text{free 5-FU}})$$

All measurements were run in duplicate and mean values \pm standard deviations are reported.

2.5.5. Determination of encapsulated Cu-PEI complex

The property of Cu-PEI complex to exhibit a second maxima absorbance peak at 630 nm (Ungaro *et al.*, 2003) was used to quantify the Cu-PEI content of purified liposomes before and after 5-FU encapsulation, using a calibration curve at 630 nm of the 600 mM-417 mM complex. 50 μL of liposomes were destroyed by adding Triton X-100 (2.5% v/v final concentration) in 2 ml PBS and sonication in a sonicator bath (Branson, USA) before absorbance reading at 630 nm.

2.6. Dynamic light scattering

Mean hydrodynamic diameter (d_H) and polydispersity index (PDI) of liposomes were determined using a Malvern Zetasizer Nano ZN (Malvern, UK, He-Ne laser 633 nm) based on quasi-elastic light scattering. Measurements were carried out at 20°C and intensity correlation

functions were measured at a scattering angle of 173° . The d_H was obtained from the Stokes-Einstein relation. Viscosity of the suspension was taken into account using tabulated values from the literature. The ζ -potential of liposomes dispersed in 10 mM PBS (1776 mM dextrose) was measured. Prior to measurements, small aliquots of liposomes (50 μ L) were diluted into 950 μ L of milliQ water.

2.7. *In vitro* temperature-dependent drug release from liposomes

To determine 5-FU temperature-dependent release, purified liposomes at 5 and 30 mol% CHOL, were tested. 5-FU-loaded liposomes were purified by ultracentrifugation followed by pellet resuspension into iso-osmotic 10 mM PBS (64 mM dextrose, pH 7.4), while 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes were purified as described previously. For 5-FU-loaded liposomes, 200 μ L of liposomes were diluted into 300 μ L of 10 mM PBS (64 mM dextrose, pH 7.4) before exposure to hyperthermia, whereas for 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes, 25 μ L liposomes were diluted in 375 μ L 10 mM PBS (1776 mM dextrose pH 7.4). Releases induced by hyperthermia using a water bath or FUS were then compared.

In water bath experiments, temperature-dependent release studies were run from 25 to 49°C . For each temperature, heating was applied during 10 min in an eppendorf tube placed in a water bath. 5-FU time-dependent release was also carried out at 42°C for 5 to 30 min.

In FUS experiments, waves were generated from a single-element homemade transducer (47 mm diameter) focused at 48 mm with a center frequency of 1 MHz. The transducer was driven with an electrical signal generated by an arbitrary waveform generator (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California, USA) and amplified with a power amplifier (ADECE, Artannes sur Indre, France). Adapted from Mannaris *et al.* (Mannaris *et al.*, 2013), the *in vitro* setup consisted of a sample holder (30 mm height, 6 mm inside diameter, 8 mm outside diameter; Fischer Scientific SAS, Illkirch, France) containing the solution of liposomes placed into a pure glycerol-filled polystyrene cuvette (45 mm height, 10 mm inside diameter, 12 mm outside diameter; Fischer Scientific SAS, Illkirch, France). Over the sides of the two containers placed in the front of the transducer, acoustical windows with 20- μ m thick polyolefin heat shrink film (Rajashrink, Roissy, France) were placed to avoid ultrasound attenuation and reflection (Escoffre *et al.*, 2013). The center of the double compartment (sample holder + cuvette) was immersed in a water tank maintained at 37°C and positioned along the *propagation axis* of the ultrasound beam. Thereby, liposomes were exposed to 1 MHz sinusoidal ultrasonic waves with a pulse repetition period of 1 ms, 400 cycles per pulse, corresponding to a 40% duty cycle. In a first set of experiments, different peak negative pressures ranging from 0 to 2 MPa were evaluated. For each acoustic pressure, ultrasound waves were applied during 10 min. In this

range of pressure amplitude, the temperature elevation, measured by a calibrated thermocouple, varied from 0 to +12°C at the focus (Novell *et al.*, 2012). In the second set of experiments, the pressure amplitude was fixed to 1.75 MPa while the total exposure time varied from 0 to 30 min. Thereafter, samples were cooled down in an ice bath and then stored at 4°C.

For analysis of released 5-FU after hyperthermia exposure, 5-FU-loaded liposomes samples were diluted into 1.5 mL 10 mM PBS (64 mM dextrose) and ultracentrifuged for 4 h at 4°C and 40,000 rpm (150,000g). Supernatants were collected and 5-FU concentration was measured by HPLC. For 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes, samples were transferred into 0.5 mL Amicon Ultra centrifugal filters and spun at 14,000g, for 30 to 50 min for non diluted samples, and for 5 to 10 min for diluted samples, depending on the CHOL mol%, using a tabletop Eppendorf centrifuge 5418 (Hamburg, Germany). Subsequently, ultrafiltrates containing released 5-FU were collected and 5-FU was quantified by HPLC. Chromatographic conditions described above resulted in an overlap of peaks arising from Cu and 5-FU at 266 nm. Therefore, those conditions were optimized to obtain a single 5-FU chromatographic peak. For this purpose, EDTA was added to the mobile phase at 5 mM, pH 4.5 to sequester Cu from the 5-FU-Cu-PEI complex.

The percentage of released 5-FU was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ release} = \frac{M_s - M_c}{M_t} \times 100$$

Where M_s was the quantity of released 5-FU at a specific temperature, M_c the quantity of 5-FU spontaneously released from a control sample, corresponding to the control treated as samples without heating (stored at 4°C until dosage) and M_t the total quantity of 5-FU encapsulated into liposomes, obtained by solubilizing liposomes upon addition of methanol (90%, v/v). For each condition, the experiment was independently repeated twice.

2.8. Cells and cell culture

The HT-29 (human colorectal adenocarcinoma) cell line was purchased from American Tissue Culture Collection (ATCC). McCoy's 5A modified medium containing sodium bicarbonate buffer (2.2 g/L) and L-glutamine was provided by Gibco life technologies (Saint Aubin, France). Fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA and penicillin/streptomycin were supplied by Lonza Biowhittaker (Amboise, France). HT-29 cells were cultured as an adherent monolayer culture in 75 cm² culture flasks in McCoy's 5A modified medium supplemented with 10% decompemented FBS and 0.5% penicillin/streptomycin at 37°C in humidified air with 5% CO₂ atmosphere. Cultures were passaged twice weekly by harvesting adherent cells by brief exposure to Trypsin-Versene® (EDTA) (1X) for up to 12 passages. Viability was

assessed by CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) from Promega (Promega Corporation, Madison, USA). To determine cell viability, HT-29 cells were seeded at a density of 2,500 cells per well in a 96-well plates and incubated for 24 h, the time required to be in a log phase, before the addition of different samples. Serially diluted unloaded and purified loaded liposome samples, free 5-FU, free Cu-PEI complex and free 5-FU-Cu-PEI were added with 50 µL fresh media over cells. Then plates were incubated for 2 days. Thereafter, supernatants were aspirated, the MTS reagent was diluted to the 6th with fresh medium and added in each well (100 µL/well) and plates were incubated for additional 2 h at 37°C. Subsequently absorbance in each well was measured spectrophotometrically at 492 nm using a microplate reader (Multiskan MS Type 352, Labsystems, Finland) and the percentage of viable cells was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ cell viability} = \frac{(A_{treated} - A_{MTS})}{(A_{control} - A_{MTS})} \times 100$$

Where $A_{treated}$ is the absorbance of cells treated with the various samples, A_{MTS} is the absorbance of 100 µL of MTS reagent diluted with fresh medium in no cell well and $A_{control}$ is the absorbance of untreated cells (exposed to fresh medium). Experiments were run in triplicate.

2.9. Statistical analysis

All results are expressed as the mean \pm standard deviation. Statistical analysis was performed with the two way ANOVA, followed by Sidak's multiple comparison test using GraphPad Prism version 6.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). A difference with $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Physicochemical characterization of liposomes

Liposomes made of DPPC/CHOL/DSPE-PEG at 95:0:5 mol% and 90:5:5 mol% were chosen as thermosensitive formulations while DPPC/CHOL/DSPE-PEG at 65:30:5 mol% was used as the negative control. Liposomes with hydrodynamic diameters d_H between 80 and 140 nm, and PDIs below 0.15 were obtained. For an amount of CHOL of 0 and 5 mol%, d_H is stable around 80 nm and PDIs do not vary significantly as a function of the 5-FU:lipid ratio (Table 1). However, as the percentage of CHOL increases from 5 to 30 mol% for a given 5-FU:lipid ratio, liposome d_H increases from about 80 nm to 110-140 nm (Table 1). For an amount of CHOL of 30 mol%, the d_H increases as the initial lipid concentration increases. The initial 5-FU concentration does not significantly impact liposome diameter. For all conditions tested, the PDIs remained satisfying below 0.15, therefore ensuring a rather narrow size distribution.

Table 1. Liposome hydrodynamic diameters and PDI as a function of the initial 5-FU:lipid ratio. Liposomes were extruded 10 times and subsequently diluted in PBS prior to measurement. Data are expressed as mean \pm SD (n = 3).

Liposome type	5-FU:lipid ratio (mM:mM)	CHOL (mol%)	Hydrodynamic diameter d_H (nm) (mean \pm SD)	PDI (mean \pm SD)
5-FU-loaded liposomes	12:12	0	83 \pm 5	0.12 \pm 0.06
		5	78 \pm 1	0.09 \pm 0.01
		30	108 \pm 10	0.07 \pm 0.02
	12:40	0	82 \pm 1	0.14 \pm 0.06
		5	78 \pm 1	0.08 \pm 0.01
		30	121 \pm 25 ^a	0.09 \pm 0.03
	53.8:40	0	82 \pm 3	0.12 \pm 0.01
		5	85 \pm 4	0.07 \pm 0.02
		30	123 \pm 18 ^a	0.08 \pm 0.02
	53.8:80	0	83 \pm 4	0.09 \pm 0.01
		5	82 \pm 4	0.08 \pm 0.01
		30	142 \pm 11 ^a	0.09 \pm 0.01

^aLiposomes were extruded 5 or 7 times due to long extrusion cycles (4 h).

3.2. 5-FU encapsulation efficacy

For a given 5-FU:lipid ratio, all formulations exhibit the same encapsulation efficacy of 5-FU. Only a mild increase of 5FU encapsulation was observed for 30 mol% CHOL. 5-FU encapsulation efficacy increases as lipid concentration raises: from around 4 to 25% as lipid concentration passes from 12 mM up to 80 mM. However, when 5-FU concentration increases from 12 to 53.8 mM while the lipid concentration is kept constant (40 mM), no encapsulation improvement could be obtained. To analyze the rate of association of 5FU, the total lipid amount of purified liposomes was determined. Figure 1 shows 5-FU:lipid final ratio (mmol:mmol). It can be that 5-FU:lipid ratio increases from 0.05:1 to 0.19:1, for 0 and 5 mol% CHOL formulations, and from 0.06:1 to 0.22:1 for 30 mol% CHOL formulation, as 5-FU:lipid initial ratio varies from 12 mM:12 mM to 53.8 mM:40 mM. One can notice that the drug:lipid final ratio is similar with 5-FU:lipid initial ratio of 53.8 mM:40 mM and 53.8 mM:80 mM. There is therefore no advantage in increasing lipid concentration. The formulation obtained with an initial ratio 53.8 mM:40 mM therefore appears the more appropriate liposomal system for further studies. Following ultracentrifugation and pellet resuspension in 500 μ L, this formulation containing 5mol% CHOL yielded a final encapsulated 5-FU concentration of 3.6 mg/mL into 5 mol% CHOL liposomes.

3.3. Temperature-dependent 5-FU release from 5-FU-loaded liposomes

5-FU release from liposomes composed of 5 or 30 mol% CHOL upon either water bath heating or FUS heating shows that 5-FU is quickly leaking out from the vesicles independently from any heating (Supplementary information, Figure S1). For these samples, as also observed with the control sample kept at 4°C, up to 90% of the encapsulated 5-FU is released.

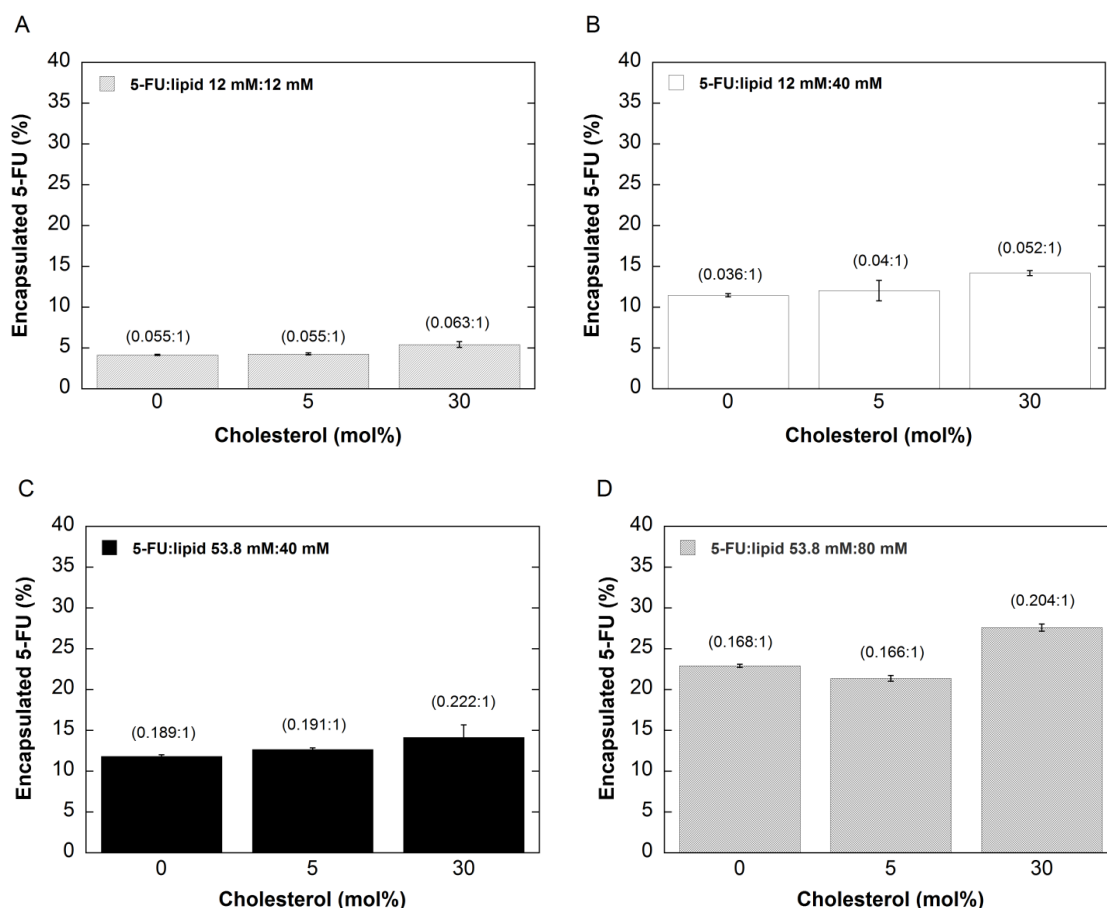


Figure 1. 5-FU encapsulation into liposomes containing 0, 5 or 30 mol% CHOL as a function of drug to lipid initial ratio (mM:mM). Panels represent 5-FU encapsulation efficacy for A) 5-FU:lipid 12 mM:12 mM, B) 5-FU:lipid 12 mM:40 mM, C) 5-FU:lipid 53.8 mM:40 mM and D) 5-FU:lipid 53.8 mM:80 mM. The corresponding 5-FU:lipid final ratios (mmol:mmol) are given between brackets above the histograms. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 2-3$).

3.4. Copper and polyethylenimine concentrations optimization and liposome formulation

Given the poor retention of 5-FU in liposomes, an alternative strategy derived from the method described by Thomas *et al.* (Thomas *et al.*, 2011) was tested in which 5-FU was entrapped in the liposomes together with Cu-PEI forming a ternary complex. Briefly, a coordination complex of Cu with low molecular weight PEI is encapsulated within liposomes, which are further purified from the unencapsulated complex. Then, 5-FU is incubated with Cu-

PEI loaded liposomes and ternary complex formation drives the encapsulation of the drug. The influence of Cu and PEI concentration and of the resulting Cu-PEI complex on liposomes formulation was investigated. The Cu acetate solution spectrum exhibits a maximum of absorption at 260 nm (Figure 2) and appears turquoise blue. When PEI is added, the color turns into a deep blue and the absorbance maximum shifts towards longer wavelengths at 285 nm with a secondary maximum at 630 nm (Figure 2). This shift indicates Cu complexation. When PEI concentration is fixed at 1630 mM and Cu concentration increases, absorbance increases for both wavelengths (285 and 630 nm) indicating that all Cu ions are complexed (Figure 2).

Cu concentration was then fixed to 600 mM and PEI concentration varied between 167 mM and 1300 mM. For the high PEI concentration, a complex solution was prepared to hydrate a lipid film containing 5 mol% CHOL. The resulting solution was too viscous and liposomes extrusion was very slow and did not allow sufficient extrusion cycles to yield satisfying sizes. Formulations prepared with 417 and 833 mM PEI were extruded at least 10 times and allowed to obtain liposomes below 200 nm (Figure 3). In particular, the liposomes containing Cu-PEI (600 mM-417 mM) showed a good and stable size around 65 nm after 10 extrusion cycles. This formulation was thus chosen as a compromise between optimal liposome size and a moderate PEI concentration. The resulting osmolarity was 1957 mosm/kg reflecting the influence of the highly charged PEI.

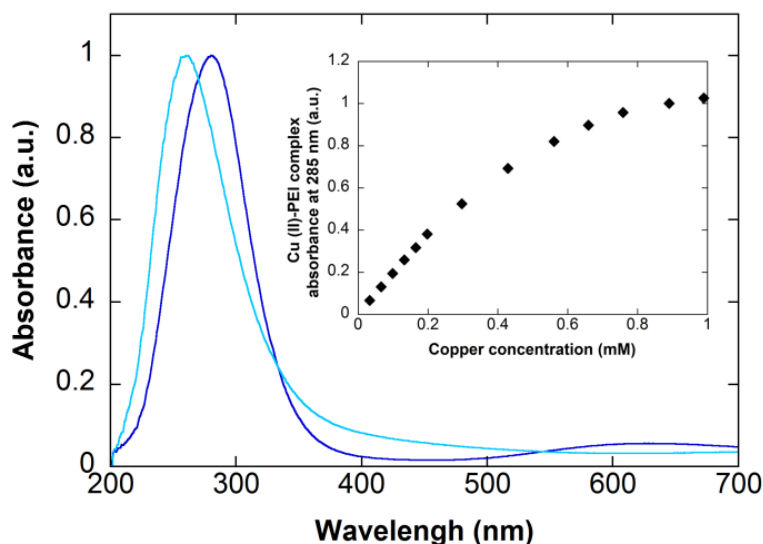


Figure 2. Absorbance spectra of Cu acetate (light blue) and of Cu-PEI complex in PBS (dark blue). The inset shows the influence of Cu concentration on the absorbance of the Cu-PEI complex at 285 nm. The initial PEI concentration was 1630 mM, and the final PEI concentration after dilution was 1 mM.

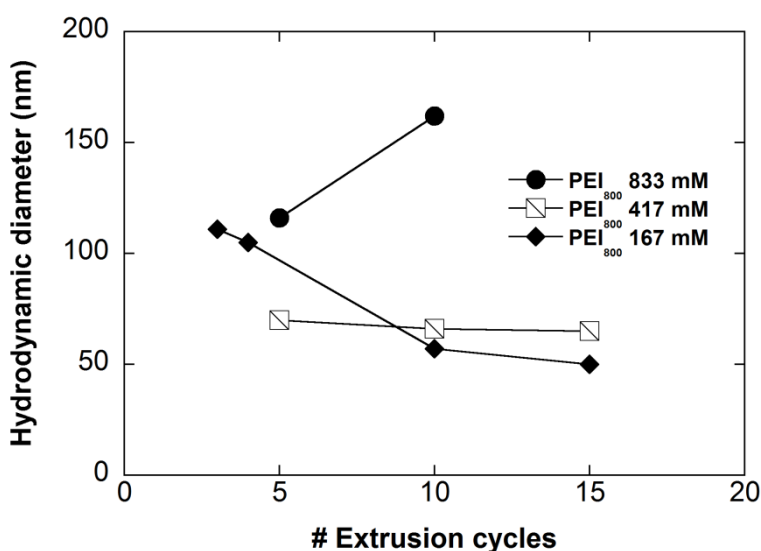


Figure 3. Preliminary results of the size of liposomes composed of 5 mol% CHOL encapsulating Cu-PEI complex at different polymer concentrations. Cu concentration was 600 mM.

3.5. Preparation and physicochemical characterization of liposomes

Two liposomal formulations were produced using Cu-PEI (600 mM-417 mM) as hydration solution: DPPC/CHOL/DSPE-PEG at 90:5:5 mol% as TSLs formulation and DPPC/CHOL/DSPE-PEG at 65:30:5 mol% as the non thermosensitive negative control. Table 2 summarizes liposome sizes and PDIs. Cu-PEI-loaded liposomes were dispersed into PBS (+

1776 mM dextrose) following purification from the non-encapsulated Cu-PEI complex to yield an osmotic pressure identical to the Cu-PEI solution. The hydrodynamic diameter d_H is around 65 nm for 5 mol% CHOL and around 100 nm for 30 mol% CHOL with PDIs below 0.1. These values are smaller than those of unloaded liposomes dispersed in PBS but are similar to values obtained from unloaded liposomes dispersed in PBS and 1776 mM dextrose (Table 2). As observed before, liposomes with 30 mol% CHOL are larger. Zeta potential values of Cu-PEI-loaded liposomes are less negative (around -6 or -3 mV) than those of unloaded liposomes (around -14 mV) (Table 2).

Table 2. Overview of liposome formulations. Samples were diluted either in 10 mM PBS or in 10 mM PBS + 1776 mM dextrose for size measurement and in deionized water for zeta potential measurement. Data are expressed as mean \pm SD (n = 3).

Liposome type	Hydration Solution	CHOL (mol%)	5-FU:lipid Initial ratio (mM:mM)	d_H (nm) (mean \pm SD)	PDI (mean \pm SD)	ζ -Potential (mV) (mean \pm SD)
Unloaded	PBS	5	0:80	87 \pm 6	0.12 \pm 0.05	- 14.9 \pm 5.9
		30		127 \pm 12	0.09 \pm 0.02	- 17.6 \pm 5.6
	PBS + 1776 mM dextrose	5		56 \pm 1	0.12 \pm 0.04	- 15.2 \pm 5.3
		30		97	0.1 \pm 0.06	- 13.1 \pm 6.1
5-FU-loaded liposomes	5-FU/PBS	5	53.8:40	88 \pm 6	0.06 \pm 0.01	- 13.4 \pm 6.9
		30		122 \pm 15	0.07 \pm 0.02	- 14.8 \pm 6.3
	5-FU/PBS + 1776 mM dextrose	5		61 \pm 3	0.15 \pm 0.01	- 15.7 \pm 5.1
		30		74 \pm 7	0.06 \pm 0.02	- 15.9 \pm 5
Cu-PEI-loaded liposomes	Cu-PEI/PBS	5	0:80	66 \pm 3	0.08 \pm 0.00	- 6.6 \pm 4.5
		30		102 \pm 13	0.07 \pm 0.01	- 2.9 \pm 5.2
5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes	Cu-PEI/PBS	5	53.8:40	65 \pm 4	0.09 \pm 0.01	- 10.2 \pm 5.2
		30		105 \pm 8	0.06 \pm 0.01	- 4.9 \pm 4.1

3.6. 5-FU active encapsulation into Cu-PEI-loaded liposomes

Since DPPC phase transition temperature T_m is 41.5 \pm 0.5°C (Djanashvili *et al.*, 2011), to avoid the disruption of Cu-PEI-loaded liposomes during their incubation with 5-FU for active encapsulation, incubation temperature was set at 30°C and active entrapment was followed over time. The encapsulation kinetic is presented in Figure 4. The initial phase of encapsulation was

immediate reaching 28% for liposomes containing 30 mol% CHOL at 0 h, while no immediate encapsulation was observed for the 5 mol% CHOL formulation (Figure 4). However, 5-FU was then speedily encapsulated within 2-4 h into both formulations with 39% of 5-FU encapsulated in the TSLs formulation and 44% in the control formulation, respectively, after only 4 h of incubation. A plateau is reached after 24 h incubation yielding to an encapsulated 5-FU concentration of 2.7 mg 5-FU/mL (Figure 4).

5-FU-Cu-PEI-loaded formulations were then characterized in terms of size, polydispersity and zeta potential. No differences could be observed as compared with Cu-PEI-loaded formulations (Table 2). In particular, active encapsulation of 5-FU into Cu-PEI-loaded liposomes does not change importantly the surface charge. This support the fact that 5-FU does not interact with the lipid bilayer. After purification, liposomes were characterized in terms of 5-FU:lipid ratio and Cu:lipid ratio. The 5-FU:lipid ratio is similar around 1:2 for TSLs and negative control formulation, (Table 3). Cu:lipid ratio is also approximately 1:2 for the TSLs formulation and slightly larger around 1.3:2 for the negative control formulation. The addition of 5-FU does not significantly modify these ratios. Finally, the 5-FU:Cu ratio is similar around 1:1 indicating that each 5-FU molecule is associated to one Cu (Table 3).

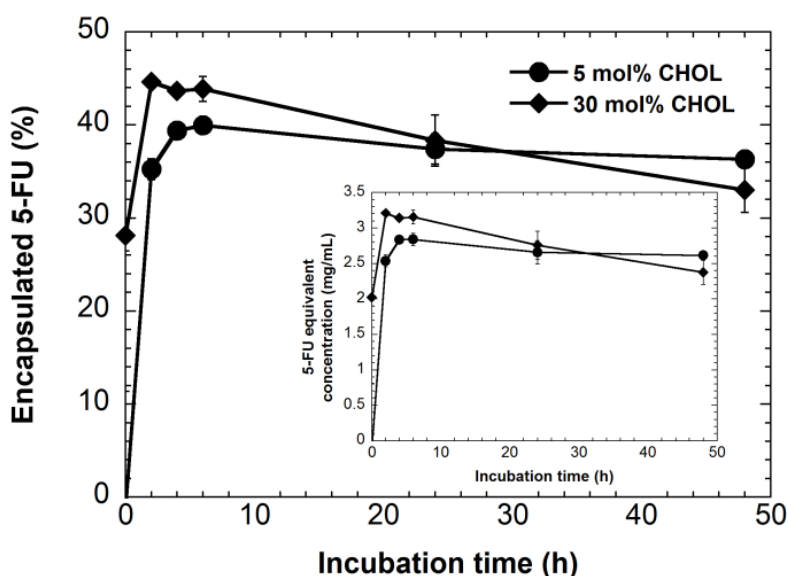


Figure 4. 5-FU active entrapment kinetics as Cu-PEI-loaded liposomes containing 5 or 30 mol% CHOL were incubated at 30°C with 107.6 mM 5-FU (10 mM PBS + 1665 mM dextrose, pH 7.4). Inset: Equivalent 5-FU final encapsulated concentration. Data are expressed as mean \pm SD (n = 2-3).

Table 3. 5-FU:lipid, 5-FU:Cu and Cu:lipid ratios of purified liposomes after 24 h of incubation with 5-FU.

Formulation	Composition CHOL (mol%)	5-FU:lipid Ratio (mmol:mmol)	5-FU:Cu ratio (mmol:mmol)	Cu:lipid ratio (mmol:mmol)
Cu-PEI-loaded liposomes	5	-	-	1.1:2
	30	-	-	1.44:2
5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes	5	1.04:2	1.02:1	1.02:2
	30	1.12:2	0.92:1	1.22:2

3.7. *In vitro* temperature-dependent 5-FU release from 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes

5-FU release from liposomes upon exposure to hyperthermia was then performed using either a water bath or FUS. Figure 5A shows the release profile of 5-FU as a function of temperature after 10 min exposure to hyperthermia in a water bath. At 4°C, spontaneous release is low for both formulations (< 1%). At 37°C, heating induces the release of $12 \pm 0.3\%$ and $9 \pm 2\%$ of 5-FU from 5 mol% and 30 mol% CHOL formulations, respectively. As temperature increases from 37°C to 49°C, up to 70% of 5-FU is released from the 5 mol% CHOL formulation whereas only $33 \pm 2\%$ is released from the 30 mol% CHOL formulation.

FUS was then applied for 10 min at various driving pressure and 5-FU release was determined (Figure 5B). When no ultrasound is applied (0 MPa), as samples are maintained in a double compartment setup positioned in a water tank at 37°C (Escoffre *et al.*, 2013), 5-FU release is equivalent to what was obtained previously in a water bath: $13 \pm 5\%$ and $9 \pm 2\%$ (Figure 5A). Interestingly, as the acoustic pressure is increased from 0 to 1 MPa, up to $47 \pm 0.1\%$ of 5-FU is released from 5 mol% CHOL formulation whereas only $12.6 \pm 16\%$ is released from 30 mol% CHOL formulation. As the applied acoustic pressure increases to 1.25 MPa, 5-FU release yields $68 \pm 0\%$ and $19 \pm 2\%$, respectively for 5 mol% and 30 mol% CHOL. For higher acoustic pressures, 5-FU release from 5 mol% CHOL liposomes reaches a plateau close to 68%. On the other hand, 5-FU keeps being released with up to 32% at 2 MPa for 30 mol% CHOL.

Release kinetics at 1.75 MPa was then followed (Figure 5C). Results indicate that, for both formulations, 5-FU is progressively released during the first 10 min before reaching a plateau. As observed before, 5-FU release from 5 mol% CHOL liposomes is higher than for 30 mol% CHOL liposomes (60% versus 20%).

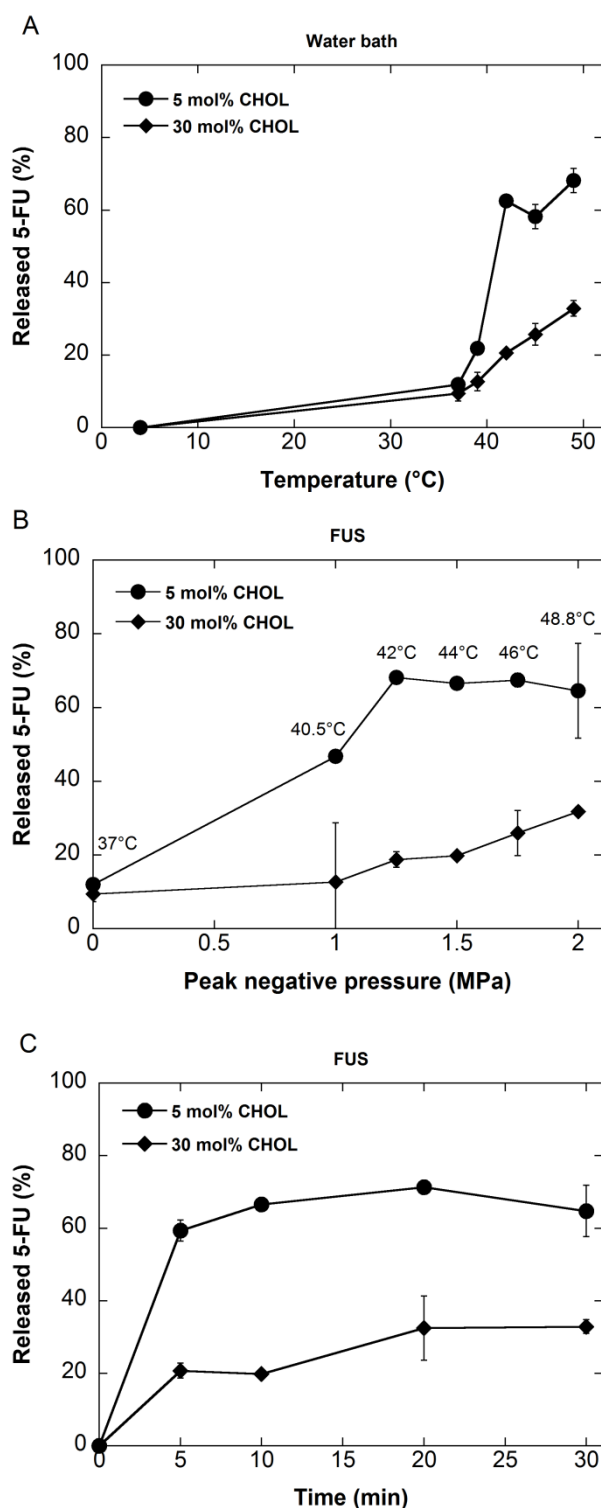


Figure 5. Release profile in PBS of encapsulated 5-FU-Cu-PEI from 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes upon heating for 10 min in A) water bath at 37, 39, 42, 45 and 49°C after dilution by 10 mM PBS (1776 mM dextrose) B) FUS setup at 1, 1.25, 1.5 1.75 and 2 MPa and C) FUS setup at 1.75 MPa for 5, 10, 20 and 30 min. Temperature increment induced by FUS was measured at the focal distance using a thermocouple placed into the sample holder. Samples were compared to a control of each formulation kept at 4°C. Data are expressed as mean \pm SD (n = 2).

3.8. Cytotoxicity

Formulations were then evaluated in terms of cytotoxicity on HT-29 human colon cancer cells using the MTS assay that considers cell mitochondrial activity. Cell viability was evaluated as a function of 5-FU concentration, lipid concentration and Cu concentration (Figure 6).

5-FU, at doses lower than 1 μM , has almost no inhibitory effect on HT-29 cells (Figure 6A and 6B). Above 1 μM 5-FU, HT-29 cell viability decreases in a dose-dependent manner with an inhibitory concentration (IC_{50}) of $172 \pm 77 \mu\text{M}$ (Table 4). The 5-FU-Cu-PEI ternary complex exhibits typically the same behavior and the $\text{IC}_{50} = 115 \pm 67 \mu\text{M}$ is similar as uncomplexed 5-FU (Table 4). When encapsulated into liposomes, the overall viability behavior is similar except that IC_{50} values are slightly lower: around 50 μM for 5 mol% CHOL liposomes and from 40 to 100 μM for 30 mol% CHOL liposomes. The effect of lipids on cell viability is presented in Figures 6C and 6D. When liposomes are loaded with 5-FU or 5-FU-Cu-PEI, cell viability decreases. The IC_{50} is of 200 to 400 μM in the case 5-FU-loaded liposomes for 5 and 30 mol% CHOL and around 80 μM for 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes whatever the amount of CHOL. For unloaded liposomes and Cu-PEI loaded liposomes, cell viability always remains higher than 80% except for very high concentrations. Finally, cell viability was evaluated as a function of Cu concentration (Figures 6E and 6F). In all cases, cell viability decreases in a Cu concentration-dependent manner. The IC_{50} of Cu-PEI solution is very high around 6mM and decreases down to about 1.3mM for 5-FU-Cu-PEI solution. For Cu-PEI loaded liposomes, the IC_{50} could not be determined but is above 500 μM independently of CHOL percentage. For 5-FU-Cu-PEI-loaded liposomes, the IC_{50} decreases down to 50 μM independently of the amount of CHOL.

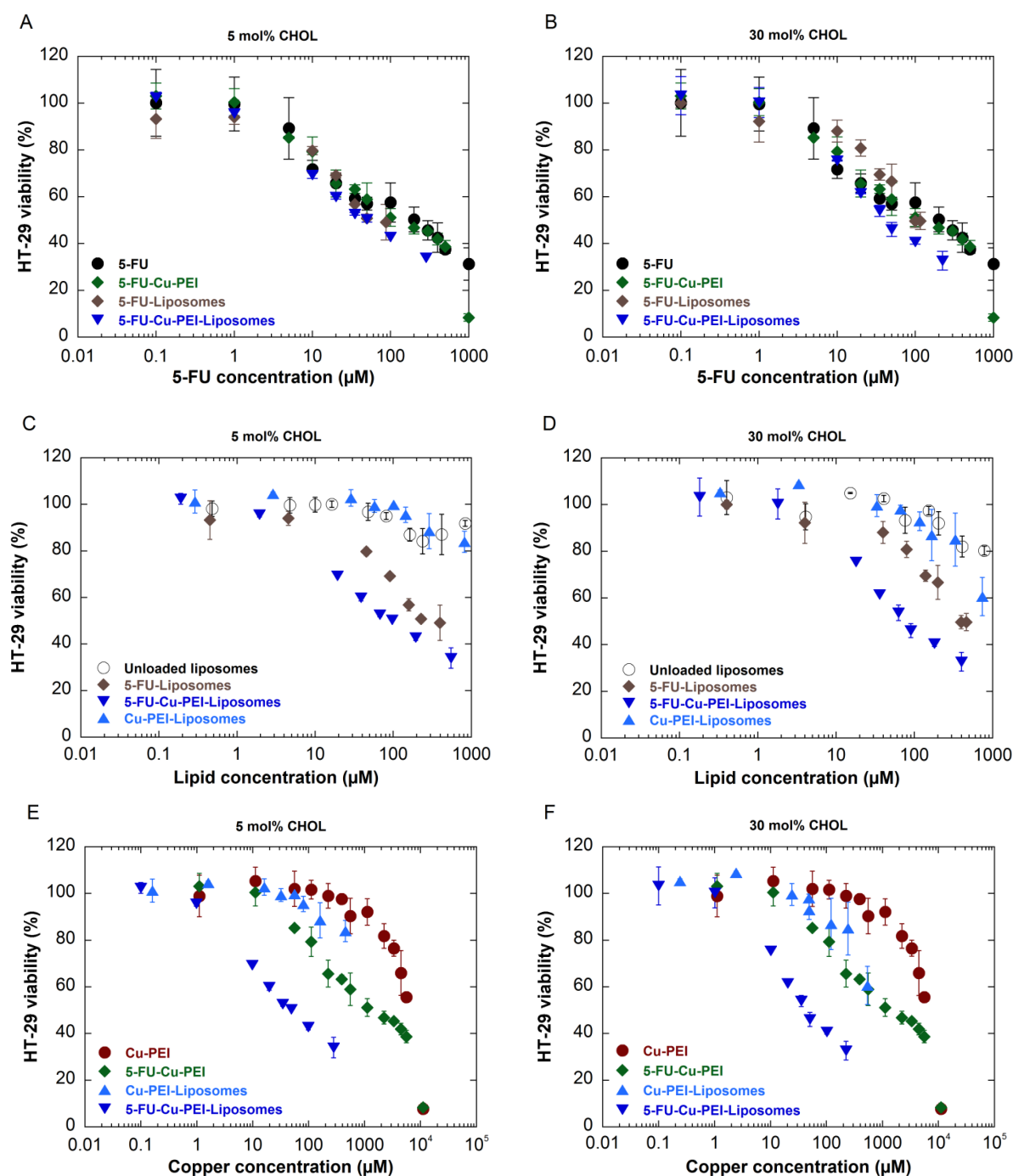


Figure 6. HT-29 cell viability determined using the MTs assay after 48 h exposure to formulations and controls. Viability was plotted as a function of 5-FU concentration (A and B), lipid concentration (C and D) or Cu concentration (E and F). Each point represents the mean \pm SD ($n = 3$) from 3 independent experiments, each performed in triplicate.

Table 4. Inhibitory concentration (IC₅₀) of the different formulations and controls in terms of 5-FU, Cu or lipid concentration on HT-29 cells after 48 hours exposure as revealed by the MTS assay. NC = does not contain CHOL. Data are expressed as mean \pm SD (n = 3) from 3 independent experiments, each performed in triplicate.

Considered toxic compound	Formulation	CHOL (mol%)	IC ₅₀ (μ M) (mean \pm SD)
5-FU	5-FU solution	NC	172 \pm 77
	5-FU-Cu-PEI ₈₀₀ solution	NC	115 \pm 67
	5-FU-loaded liposomes	5	49 \pm 0.7
		30	98 \pm 14
	5-FU-Cu-PEI ₈₀₀ -loaded liposomes	5	49 \pm 6
		30	43 \pm 6
Cu	Cu-PEI ₈₀₀ solution	NC	6225 \pm 106
	5-FU-Cu-PEI ₈₀₀ solution	NC	1283 \pm 742
	Cu-PEI ₈₀₀ -loaded liposomes	5	> 460
		30	> 538
	5-FU-Cu-PEI ₈₀₀ -loaded liposomes	5	48 \pm 7
		30	45 \pm 5
Lipids	Unloaded liposomes	5	> 833
		30	> 782
	Cu-PEI ₈₀₀ -loaded liposomes	5	> 820
		30	> 740
	5-FU-loaded liposomes	5	188 \pm 48
		30	352 \pm 46
	5-FU-Cu-PEI ₈₀₀ -loaded liposomes	5	96 \pm 9
		30	73 \pm 7

4. Discussion

The objective of this study was to prepare thermosensitive 5-FU liposomes with optimum loading and stability. Two different methods of encapsulation were considered to improve 5-FU encapsulation and retention: passive and active encapsulation. The release profile of 5-FU from TSLs and their negative control was studied under hyperthermia generated by either water bath heating or FUS heating. Finally, formulation cytotoxicity was evaluated. The requirements for a 5-FU TSLs formulation are first a sufficient drug-loading compatible with the dose needed for injection and second a good drug retention into the aqueous compartment until actual administration and application of hyperthermia.

Regarding passive encapsulation, an impact of CHOL content is observed as liposomes containing 0 and 5 mol% CHOL exhibit a smaller hydrodynamic diameter d_H compared to those made with 30 mol% CHOL. The larger size of 30 mol% CHOL liposomes can be explained by

the higher rigidity of the lipid bilayer (Allen *et al.*, 1991; Semple *et al.*, 1996), that makes the extrusion process more difficult since these liposomes do not possess a gel to liquid transition temperature (Al Sabbagh *et al.*, 2014). The rigidity of the lipid bilayer also explains the increase of hydrodynamic diameter (110 to 140 nm) as lipid concentration increases from 12 to 80 mM in vesicles made with 30 mol% CHOL. The higher the lipid concentration, the more viscous the suspension and the longer the extrusion process (up to 4 h for one cycle). One can notice that the presence of 5-FU passively encapsulated does not modify liposome hydrodynamic diameter regardless of the initial 5-FU concentration. Indeed, since 5-FU is very hydrophilic drug, it does not interact with liposome bilayer (Ozer and Talsma, 1989; Fresta *et al.*, 1993).

5-FU encapsulation efficacy depends strongly on initial 5-FU and lipid concentrations. Indeed, the higher the lipid concentration, the more numerous the liposomes, leading to a larger encapsulated aqueous volume and therefore a higher encapsulation of 5-FU (Ozer and Talsma, 1989; Fresta *et al.*, 1993). Increasing the initial concentration of 5-FU logically leads to an increase of the amount encapsulated in the aqueous compartment. Therefore, the higher encapsulation of 5-FU in 30 mol% CHOL liposomes prepared at high initial lipid concentrations (40 and 80 mM), compared to 5 mol% CHOL liposomes would arise from the higher encapsulated volume since the vesicles are larger in the presence of large amount of CHOL. 5-FU encapsulation seems to reach a plateau around 0.2:1 5FU:lipid ratio. Encapsulation is limited by 5-FU solubility (53.8mM): as lipid concentration increases, the number of liposomes formed increases but the 5-FU:lipid ratio remains identical. Hence, 40 mM lipid initial concentration appears to be an optimum between good encapsulation and excipient cost. Passive encapsulation allows to yield a 5-FU concentration of up to 3.6 mg 5-FU/mL compatible with an efficient treatment *in vivo* on HT-29 xenograft tumors in mice (injection of 20-40 mg 5-FU/kg) (Thomas *et al.*, 2011; Hare *et al.*, 2013). These results are in agreement with literature, where similar encapsulation efficacy of 5-FU has been reported for DPPC liposomes (Ozer and Talsma, 1989; Fresta *et al.*, 1993).

The results of temperature-dependent 5-FU release are in accordance with previous data available in literature demonstrating that 5-FU is poorly retained into unilamellar liposomes due to quick leakage (Ozer and Talsma, 1989; Elorza *et al.*, 1993; Fresta *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 2011). Various techniques have been suggested to improve 5-FU retention such as the formulation of stable multilamellar vesicles (Fresta *et al.*, 1993), lyophilisation of liposomes entrapping 5-FU (Glavas-Dodov *et al.*, 2005), formulation of 5-FU into pH-sensitive niosomes (Wang *et al.*, 2012), encapsulation of lipophilic derivatives of 5-FU (Semakov *et al.*, 2013), complexation of 5-FU with a Cu complex in order to enhance both of intraliposomal 5-FU

loading and retention (Thomas *et al.*, 2011). Transition metal complexation of selected drugs has been widely used to enhance drug entrapment and/or drug retention into liposomes (Ramsay *et al.*, 2008). Moreover, complexation of 5-FU by Cu-PEI exhibited higher efficacy than free 5-FU in *in vivo* (Thomas *et al.*, 2011). We therefore applied this strategy to formulate TSLs by active encapsulation.

As liposomes are loaded with the Cu-PEI complex, their size is not modified but the zeta potential decreases in absolute value (from -15 to -7 mV for 5 mol% CHOL and from -13 to -3 mV for 30 mol% CHOL liposomes) probably due to an adsorption of the positively charged complex onto negatively charged liposomes as reported by Thomas *et al.* (Thomas *et al.*, 2011). 5-FU active encapsulation does not significantly modify the zeta potential of the formulations. Even though incubation was carried out at low temperature, 5-FU active encapsulation is very quick, being somehow more rapid for 30 mol% CHOL liposomes than for 5 mol% CHOL liposomes. The difference of encapsulation kinetics remains to be fully explained. In addition, it reveals that the likely adsorption of Cu-PEI complex onto liposome surface does not prevent active encapsulation of 5-FU. Regardless their composition, dispersion of liposomes into 10 mM PBS + 1776 mM dextrose results in a decrease of their d_H (Table 2). This decrease does not arise from 1776 mM dextrose viscosity (3.317 cP at 20°C) (David R. Lide, 2005) since it was taken into account for DLS measurements. The high dextrose concentration could probably modify the conformation of PEG chains at liposome surface by changing the osmotic pressure as it occurs with conterions (Minko, 2006), therefore decreasing their overall size.

Hyperthermia-mediated release experiments show that 5-FU retention is ensured by its complexation with Cu-PEI. The higher molecular weight of the ternary complex prevents its leakage from liposomes (Thomas *et al.*, 2011). The thermosensitivity of the 5 mol% CHOL formulation as compared to the 30 mol% CHOL one, is verified using either a water bath or FUS. Indeed at 42°C, both modes of heating lead to massive release of 5-FU from the 5 mol% CHOL formulation whereas release from the 30 mol% CHOL formulation is equivalent to spontaneous release. FUS at 1 MHz and 1.75 MPa for 10 min constitute a powerful stimulus for TSLs by inducing a temperature increment of 9°C (i.e., final temperature is 46°C) at the focal point (Escoffre *et al.*, 2013). FUS is slightly more efficient than water bath heating with 68% release versus 62%. The additional release using ultrasound is in agreement with our previous results using calcein as a model molecule (Al Sabbagh *et al.*, 2014). In addition, 5-FU release from TSLs is rather fast using FUS, since there is no benefit of applying FUS for longer than 10 min in terms of release. This could be beneficial for translation to *in vivo* experiments. Usually, traditional TSLs (TTSLs) exhibit a slow drug release: only 10% of their drug load is

released in 30 min when TTSLs are exposed to a temperature range of 43-45°C *in vitro* (Gaber *et al.*, 1995). Research therefore focused on low temperature sensitive liposomes (LTSLs) based on lysolipids designed to release their content in tens of seconds as temperature is increased. The ThermoDox® formulation is an example of LTSLs as it releases 60% of its encapsulated doxorubicin in the first 20 seconds of heating at 41.3°C *in vitro* (Needham *et al.*, 2013). Our system can be considered an intermediate formulation between TTSLs and LTSLs. To the best of our knowledge, it constitutes the first thermosensitive 5-FU formulation.

At the supramolecular scale, the thermosensitivity arises from a gel to liquid crystalline phase transition of DPPC ($T_m = 41.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$) leading to conformational changes in the lipid bilayer resulting in permeability increase. The hypothesized mechanism involved in the enhancement of bilayer permeability is the formation of transient nanopores at the boundaries between solid and liquid crystalline domains in the bilayer (Needham *et al.*, 2013). The enhanced permeability of the bilayer explains the release up to 68% of 5-FU. 68% release in 10 min is a good result compared to release rates previously reported regarding TSLs free of lysolipids (Gaber *et al.*, 1995; Djanashvili *et al.*, 2011). Moreover, it is sufficient to exhibit a therapeutic effect. Inserting 30% mol of CHOL into the lipid bilayer renders liposomes non thermosensitive, resulting in a less important release due to the weak permeability of the bilayer at 46°C. The contribution of inertial cavitation generated over the course of FUS application to induce bilayer rupture by mechanical stress is discussed. However, recent data described that drug release from TSLs results from thermal and mechanical constraints induced by FUS (Novell *et al.*, 2012). We have previously published (Al Sabbagh *et al.*, 2014) that 1.75 MPa, corresponding to a temperature of 46°C at the focal point, is the optimum peak negative pressure inducing a maximum calcein release from the same TSLs over 10 min.

Many studies have demonstrated the potential of high-intensity focused ultrasound (HIFU) for localized heat-triggered drug release (Ta and Porter, 2013). *In vivo* studies showed that doxorubicin-loaded TSLs combined with ultrasound-induced mild hyperthermia resulted in higher concentration of the drug in the tumor (Dromi *et al.*, 2007; de Smet *et al.*, 2011). To our knowledge, the efficiency of ultrasound-induced hyperthermia for *in vivo* drug delivery was only evaluated for doxorubicin-loaded TSLs. Neither *in vivo* nor *in vitro* studies using 5-FU loaded TSLs have been reported. Indeed, *in vitro* reports are scarce due to the difficulty to design an adapted and efficient setup (Escoffre *et al.*, 2013). The results using 5-FU-loaded TSLs are however in good agreement with those obtained in previous *in vitro* work. Using a similar ultrasound setup, a maximal drug release of approximately 50% and 80% was reached when calcein-loaded TSLs (Novell *et al.*, 2012) and doxorubicin-loaded TSLs (Escoffre *et al.*,

2013; Mannaris *et al.*, 2013) were assessed, respectively. In a recent study, a maximal calcein release of 60% was obtained *in vitro* using liposomes modified with thermosensitive polymer insonified in a water-filled dish (Ninomiya *et al.*, 2014). However, in this study, the calcein release was only attributed to the cavitation effect of ultrasound since no sufficient temperature elevation was measured in water.

Formulations were then considered in terms of toxicity focusing either on 5-FU, Cu or lipids as potential toxic compounds. Toxicity was assessed on a HT-29 cell line sensitive to 5-FU. HT-29 cells possess a doubling time of 24 h (data not shown), therefore 48h exposure to formulations and controls were sufficient to assess toxicity and inhibition. 5-FU induces a dose-dependent inhibitory effect on HT-29 with an IC_{50} of $172 \pm 77 \mu M$. The IC_{50} values are in agreement with previously published ones on HT-29 cells after 48 h treatment ($\sim 300 \mu M$) (Sasaki *et al.*, 2010) (Figures 6A and 6B). Cu-PEI seems to be well tolerated by HT-29 cells with a 6mM IC_{50} in terms of Cu concentration, probably because low molecular weight PEIs are less toxic compared to higher molecular weight ones (Wen *et al.*, 2009). These results are consistent with available data (Thomas *et al.*, 2011). When 5-FU is complexed with Cu-PEI, its inhibitory effect on HT-29 cells is very similar to free 5-FU with a similar IC_{50} ($115 \pm 67 \mu M$): its binding does not alter its activity. Therefore the reduction of cell viability indeed arises from 5-FU. On one hand, unloaded liposomes and Cu-PEI-loaded liposomes do not reduce cell viability. On the other hand, 5-FU liposomes and 5-FU-Cu-PEI liposomes lead to a decrease in cell viability. In agreement with previous data, liposomes favor the internalization of 5-FU either free or as a ternary complex by HT-29 cells reducing therefore 2 fold its IC_{50} .

5. Conclusion

We have optimized the encapsulation and retention of 5-FU into TSLs made of DPPC/CHOL/DSPE-PEG (90:5:5 mol%) by using a ternary complex of 5-FU-Cu-PEI. 1.75 MPa FUS applied for 10 min was sufficient to induce local and homogeneous mild hyperthermia (42°C) and therefore efficient and rapid release of 5-FU. CHOL insertion within lipid bilayers made of DPPC and 5 mol% of DSPE-PEG, allows to finely tune the thermosensitivity of liposome formulations. The 5-FU-Cu-PEI ternary complex does not seem to induce additional toxicity as revealed by the MTS assay on HT-29 cells. The kinetics of dissociation of 5-FU from the ternary complex *in vivo* is worth investigating in the future. Further studies should focus on the anti-cancer efficacy of these 5-FU-Cu-PEI-loaded TSLs in pre-clinical models under FUS-induced hyperthermia.

Acknowledgments

This research work was funded by Agence Nationale de la Recherche (ANR-2010-TecSan-007). Institut Galien Paris-Sud is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

Supplementary figures

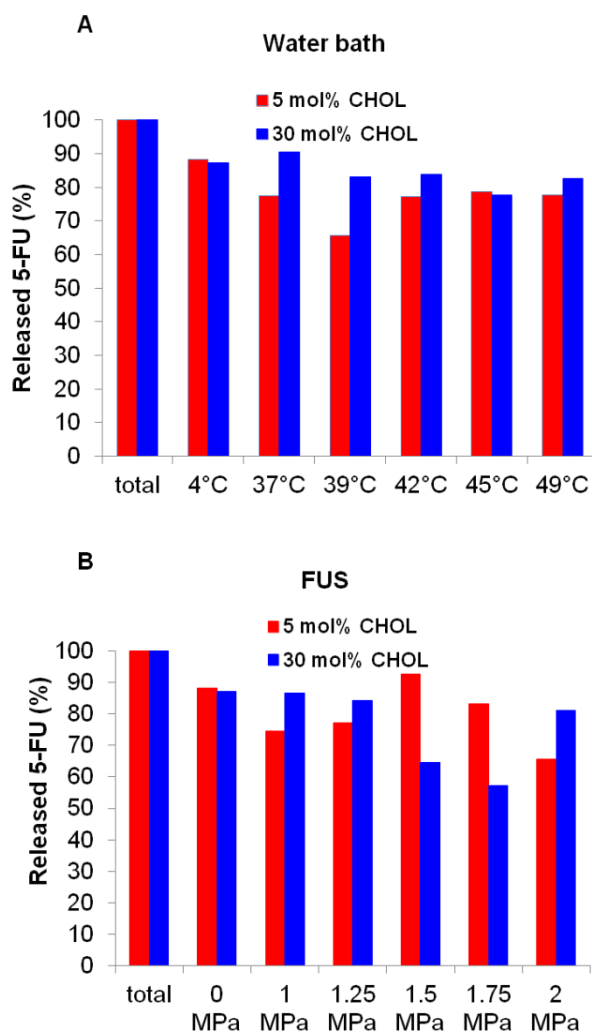


Figure S 1. 5-FU release in PBS from 5-FU-loaded liposomes upon heating for 10 min in A) water bath at 37, 39, 42, 45 and 49°C B) FUS at 0 (4°C), 1, 1.25, 1.5 1.75 and 2 MPa. Samples were compared to a control of each formulation kept at 4°C.

Références

- Al Sabbagh, C., Novell, A., Escoffre, J.-M., Gaillard, C., Tsapis, N., Fattal, E. and Bouakaz, A. (2014). "In-vitro evaluation of focused ultrasound-mediated thermal and mechanical effects on the calcein release from temperature-sensitive liposomes." Submitted.
- Allen, T. M., Austin, G. A., Chonn, A., Lin, L. and Lee, K. C. (1991). "Uptake of liposomes by cultured mouse bone-marrow macrophages - Influence of liposome composition and size." Biochimica Et Biophysica Acta **1061**(1): 56-64.
- Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C. (1965a). "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids." Journal of Molecular Biology **13**(1): 238-252.
- Crommelin, D. J. A. and Florence, A. T. (2013). "Towards more effective advanced drug delivery systems." International Journal of Pharmaceutics **454**(1): 496-511.
- David R. Lide, e. (2005). CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005, <http://www.hbcpnetbase.com>. Boca Raton, FL, CRC Press.
- de Smet, M., Heijman, E., Langereis, S., Hijnen, N. M. and Groll, H. (2011). "Magnetic resonance imaging of high intensity focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: An in vivo proof-of-concept study." Journal of Controlled Release **150**(1): 102-110.
- Djanashvili, K., ten Hagen, T. L. M., Blangé, R., Schipper, D., Peters, J. A. and Koning, G. A. (2011). "Development of a liposomal delivery system for temperature-triggered release of a tumor targeting agent, Ln(III)-DOTA-phenylboronate." Bioorganic & Medicinal Chemistry **19**(3): 1123-1130.
- Dromi, S., Frenkel, V., Luk, A., Traugher, B., Angstadt, M., Bur, M., Poff, J., Xie, J., Libutti, S. K., Li, K. C. P. and Wood, B. J. (2007). "Pulsed-High Intensity Focused Ultrasound and Low Temperature-Sensitive Liposomes for Enhanced Targeted Drug Delivery and Antitumor Effect." Clinical Cancer Research **13**(9): 2722-2727.
- El-Khoueiry, A. B. and Lenz, H. J. (2006). "Should continuous infusion 5-fluorouracil become the standard of care in the USA as it is in Europe?" Cancer Investigation **24**(1): 50-55.
- Elorza, B., Elorza, M. A., Frutos, G. and Chantres, J. R. (1993). "Characterization of 5-Fluorouracil loaded liposomes prepared by reverse-phase evaporation or freezing-thawing extrusion methods - Study of drug-release " Biochimica Et Biophysica Acta **1153**(2): 135-142.
- Escoffre, J. M., Novell, A., de Smet, M. and Bouakaz, A. (2013). "Focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: in-vitro characterization and validation." Physics in Medicine and Biology **58**(22): 8135-8151.
- Fresta, M., Villari, A., Puglisi, G. and Cavallaro, G. (1993). "5-Fluorouracil: various kinds of loaded liposomes: encapsulation efficiency, storage stability and fusogenic properties." International Journal of Pharmaceutics **99**(2-3): 145-156.

Gaber, M. H., Hong, K. L., Huang, S. K. and Papahadjopoulos, D. (1995). "Thermosensitive sterically stabilized liposomes - Formulation and in-vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma." Pharmaceutical Research **12**(10): 1407-1416.

Glavas-Dodov, M., Fredro-Kumbaradzi, E., Goracinova, K., Simonoska, M., Calis, S., Trajkovic-Jolevska, S. and Hincal, A. A. (2005). "The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU." International Journal of Pharmaceutics **291**(1–2): 79-86.

Hare, J. I., Neijzen, R. W., Anantha, M., Dos Santos, N., Harasym, N., Webb, M. S., Allen, T. M., Bally, M. B. and Waterhouse, D. N. (2013). "Treatment of Colorectal Cancer Using a Combination of Liposomal Irinotecan (Irinophore C (TM)) and 5-Fluorouracil." PLoS ONE **8**(4).

Kong, G., Braun, R. D. and Dewhirst, M. W. (2001). "Characterization of the Effect of Hyperthermia on Nanoparticle Extravasation from Tumor Vasculature." Cancer Research **61**(7): 3027-3032.

Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W. E. and Storm, G. (2012). "Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress." Journal of Controlled Release **161**(2): 175-187.

Li, L., ten Hagen, T. L. M., Schipper, D., Wijnberg, T. M., van Rhooen, G. C., Eggermont, A. M. M., Lindner, L. H. and Koning, G. A. (2010). "Triggered content release from optimized stealth thermosensitive liposomes using mild hyperthermia." Journal of Controlled Release **143**(2): 274-279.

MacMillan, W. E., Wolberg, W. H. and Welling, P. G. (1978). "Pharmacokinetics of Fluorouracil in Humans." Cancer Research **38**(10): 3479-3482.

Maeda, H. (2012). "Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond." Journal of Controlled Release **164**(2): 138-144.

Maillard, S., Ameller, T., Gauduchon, J., Gougelet, A., Gouilleux, F., Legrand, P., Marsaud, V., Fattal, E., Sola, B. and Renoir, J.-M. (2005). "Innovative drug delivery nanosystems improve the anti-tumor activity in vitro and in vivo of anti-estrogens in human breast cancer and multiple myeloma." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **94**(1–3): 111-121.

Mannaris, C., Efthymiou, E., Meyre, M.-E. and Averkiou, M. A. (2013). "In Vitro Localized Release of Thermosensitive Liposomes with Ultrasound-Induced Hyperthermia." Ultrasound in Medicine & Biology **39**(11): 2011-2020.

Mills, J. K. and Needham, D. (2005). "Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1716**(2): 77-96.

Minko, S. (2006). "Responsive Polymer Brushes." Journal of Macromolecular Science, Part C **46**(4): 397-420.

Needham, D. and Dewhirst, M. W. (2001). "The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors." Advanced Drug Delivery Reviews **53**(3): 285-305.

- Needham, D., Park, J. Y., Wright, A. M. and Tong, J. H. (2013). "Materials characterization of the low temperature sensitive liposome (LTSL): effects of the lipid composition (lysolipid and DSPE-PEG2000) on the thermal transition and release of doxorubicin." Faraday Discussions **161**: 515-534.
- Ninomiya, K., Kawabata, S., Tashita, H. and Shimizu, N. (2014). "Ultrasound-mediated drug delivery using liposomes modified with a thermosensitive polymer." Ultrasonics Sonochemistry **21**(1): 310-316.
- Novell, A., Escoffre, J. M., Al-Sabbagh, C., Mannaris, C., Fattal, E., Tsapis, N., Averkiou, M. and Bouakaz, A. (2012). Role of thermal and mechanical effects on drug release from thermosensitive nanocarriers. Ultrasonics Symposium (IUS), 2012 IEEE International.
- Okeda, R., Shibutani, M., Matsuo, T., Kuroiwa, T., Shimokawa, R. and Tajima, T. (1990). "Experimental neurotoxicity of 5-Fluorouracil and its derivatives is due to poisoning by the monofluorinated organic metabolites, monofluoroacetic acid and alpha-fluoro-beta-alanine " Acta Neuropathologica **81**(1): 66-73.
- Ozer, A. Y. and Talsma, H. (1989). "Preparation and stability of liposomes containing 5-fluorouracil." International Journal of Pharmaceutics **55**(2-3): 185-191.
- Pohlen, U., Buhr, H., Berger, G., Ritz, J.-P. and Holmer, C. (2012). "Hepatic arterial infusion (HAI) with PEGylated liposomes containing 5-FU improves tumor control of liver metastases in a rat model." Investigational New Drugs **30**(3): 927-935.
- Ramsay, E., Alnajim, J., Anantha, M., Zastre, J., Yan, H., Webb, M., Waterhouse, D. and Bally, M. (2008). "A novel liposomal irinotecan formulation with significant anti-tumour activity: Use of the divalent cation ionophore A23187 and copper-containing liposomes to improve drug retention." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **68**(3): 607-617.
- Sasaki, K., Tsuno, N. H., Sunami, E., Tsurita, G., Kawai, K., Okaji, Y., Nishikawa, T., Shuno, Y., Hongo, K., Hiyoshi, M., Kaneko, M., Kitayama, J., Takahashi, K. and Nagawa, H. (2010). "Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells." Bmc Cancer **10**.
- Semakov, A. V., Blinkov, A. A., Gaenko, G. P., Vostrova, A. G. and Molotkovsky, J. G. (2013). "Synthesis and properties of lipophilic derivatives of 5-fluorouracil." Russian Journal of Bioorganic Chemistry **39**(3): 299-305.
- Semple, S. C., Chonn, A. and Cullis, P. R. (1996). "Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes." Biochemistry **35**(8): 2521-2525.
- Stewart, J. C. M. (1980). "Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate." Analytical Biochemistry **104**(1): 10-14.
- Ta, T. and Porter, T. M. (2013). "Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy." Journal of Controlled Release **169**(1-2): 112-125.
- Thomas, A. M., Kapanen, A. I., Hare, J. I., Ramsay, E., Edwards, K., Karlsson, G. and Bally, M. B. (2011). "Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-Fluorouracil for parenteral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy." Journal of Controlled Release **150**(2): 212-219.

Ungaro, F., De Rosa, G., Miro, A. and Quaglia, F. (2003). "Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **31**(1): 143-149.

Wang, M., Yuan, Y., Gao, Y., Ma, H. M., Xu, H. T., Zhang, X. N. and Pan, W. S. (2012). "Preparation and characterization of 5-fluorouracil pH-sensitive niosome and its tumor-targeted evaluation: in vitro and in vivo." Drug Development and Industrial Pharmacy **38**(9): 1134-1141.

Wen, Y. T., Pan, S. R., Luo, X., Zhang, X., Zhang, W. and Feng, M. (2009). "A Biodegradable Low Molecular Weight Polyethylenimine Derivative as Low Toxicity and Efficient Gene Vector." Bioconjugate Chemistry **20**(2): 322-332.

Wilson, P. M., El-Khoueiry, A., Iqbal, S., Fazzzone, W., LaBonte, M. J., Groshen, S., Yang, D. Y., Danenberg, K. D., Cole, S., Kornacki, M., Ladner, R. D. and Lenz, H. J. (2010). "A phase I/II trial of vorinostat in combination with 5-fluorouracil in patients with metastatic colorectal cancer who previously failed 5-FU-based chemotherapy." Cancer Chemotherapy and Pharmacology **65**(5): 979-988.

Yatvin, M. B., Weinstein, J. N., Dennis, W. H. and Blumenthal, R. (1978). "Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia " Science **202**(4374): 1290-1293.

Chapitre 3

Pharmacocinétique et biodistribution de liposomes furtifs thermosensibles et non thermosensibles encapsulant le 5-Fluorouracile sous forme d'un complexe ternaire avec le cuivre et la polyéthylèneimine

Chapitre 3 :
Pharmacocinétique et biodistribution de liposomes furtifs thermosensibles et non thermosensibles encapsulant le 5-Fluorouracile sous forme d'un complexe ternaire avec le cuivre et la polyéthylèneimine

Chantal Al Sabbagh^{1,2}, Nicolas Tsapis^{1,2}, Hélène Chacun^{1,2}, Patricia Calleja-Gonzalez^{1,2}, Elias Fattal^{1,2*}.

¹ Univ Paris-Sud, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

² CNRS UMR 8612, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

Etude à compléter avec les résultats de l'efficacité antitumorale in vivo avant soumission à publication

Résumé

Nous avons optimisé la formulation de liposomes furtifs encapsulant le 5-Fluorouracile (5-FU) sous forme d'un complexe ternaire avec le cuivre (Cu) et la polyéthylèneimine (PEI). Les liposomes étaient soit thermosensibles (5-FU-LTS, 65 nm) soit non thermosensibles (5-FU-LNTS, 105 nm). Le taux de charge exprimé par le ratio final 5-FU : lipides était d'environ 50% (mole : mole).

Dans le but d'identifier le moment optimal pour l'application des ultrasons focalisés (FUS) *in vivo* afin de déclencher la libération du 5-FU par hyperthermie (HT), une solution de 5-FU, des 5-FU-LTS et des 5-FU-LNTS (22 mg 5-FU/kg) ont été administrés par voie intraveineuse à des souris porteuses d'un modèle de tumeur colorectale HT-29 xénogreffée. La pharmacocinétique (PK) et la biodistribution (BD) ont été ensuite évaluées.

Les pics de concentration plasmatique de 5-FU ont été atteints 0,5 h (30 min) après l'injection, indiquant le moment le plus pertinent pour l'application des FUS. Comparativement à la solution de 5-FU, les aires sous la courbe des concentrations plasmatiques de 5-FU sur 24 h étaient 1,9 et 2,9 fois plus élevées lorsque le 5-FU est administré sous forme de 5-FU-LTS et de 5-FU-LNTS, respectivement. De plus, les liposomes permettent de prolonger d'un facteur 1,4 la demi-vie plasmatique de distribution du 5-FU, en dépit de l'élimination rénale. Bien que les liposomes présentent une légère instabilité dans le sang, les 5-FU-LNTS favorisent significativement l'accumulation du 5-FU dans la tumeur. La concentration du 5-FU au niveau de la tumeur a été augmentée d'un facteur 2 par rapport à la solution de 5-FU. A notre connaissance, les résultats exposés dans la présente étude représentent les premières données *in vivo* sur les liposomes thermosensibles furtifs encapsulant le 5-FU.

Pharmacokinetics and biodistribution of stealth[®] thermosensitive and non-thermosensitive liposomes encapsulating 5-Fluorouracil as a ternary complex with copper and polyethylenimine

Chantal Al Sabbagh^{1,2}, Nicolas Tsapis^{1,2}, Hélène Chacun^{1,2}, Patricia Calleja-Gonzalez^{1,2}, Elias Fattal^{1,2*}.

¹ Univ Paris-Sud, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

² CNRS UMR 8612, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

To be completed with in vivo antitumor efficacy before submission to publication

Abstract

We have designed stealth[®] liposomes encapsulating 5-Fluorouracil (5-FU) complexed with copper (Cu) and polyethylenimine (PEI). Liposomes were either thermosensitive (5-FU-TSLs, 65 nm) or non-thermosensitive (5-FU-NTSLs, 105 nm). The final 5-FU:lipid ratio was around 50% (mol:mol).

To identify the optimal time for focused ultrasound (FUS) application to trigger drug-release by hyperthermia (HT), 5-FU solution, 5-FU-TSLs and 5-FU-NTSLs (22 mg 5-FU/kg) have been administered intravenously in mice bearing HT-29 xenograft tumor and pharmacokinetics (PK) and biodistribution (BD) were evaluated.

The plasma peak concentrations of 5-FU were achieved 0.5 h (30 min) post-injection indicating the relevant time for FUS application. Areas under the concentration-time curve (AUC_{0-24h}) were 1.9- and 2.9-fold higher when the drug was administered as the 5-FU-TSLs and 5-FU-NTSLs formulations, respectively, compared to free 5-FU. Moreover, 5-FU-TSLs and 5-FU-NTSLs prolong the plasma distribution half-life of 5-FU by a factor 1.4, despite renal elimination. Although, liposomes show slight instability in the blood, 5-FU-NTSLs reinforce significantly 5-FU accumulation in the tumor by a factor 2 compared to 5-FU solution. To the best of our knowledge, these are the first *in vivo* results on stealth[®] thermosensitive liposomes encapsulating 5-FU.

Keywords: Thermosensitive stealth[®] liposomes; 5-Fluorouracil; Pharmacokinetics; Biodistribution.

1. Introduction

Stimuli-reactive liposomes are being developed to trigger drug release upon pH (Helmlinger *et al.*, 1997), light (Agarwal *et al.*, 2011) or temperature changes (Needham *et al.*, 2000). Among these systems, thermosensitive liposomes (TSLs) are attractive since local hyperthermia (HT) can easily be externally applied (Yatvin *et al.*, 1978; Kong and Dewhirst, 1999; Needham *et al.*, 2000; de Smet *et al.*, 2011; Grüll and Langereis, 2012; Park *et al.*, 2013). Focused ultrasound (FUS) constitutes a potent technology for non-invasively applying HT in deep-situated tissues, by depositing a sufficient acoustic intensity in the focal volume, providing thus local heating (Grüll and Langereis, 2012). The combination of TSLs with HT is designed to selectively increase local drug concentration in tumors and lead to a significant improvement in therapeutic efficacy. Indeed, HT has been shown to improve drug-loaded liposomes extravasation within the heated lesion through increased perfusion and vascular permeability (Kong *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2001). This allows a significant enhancement of liposomes accumulation in tumor by 1.5- to 3-fold (Al-Jamal *et al.*, 2012) and serves as an external trigger for targeted drug release from TSLs (Yatvin *et al.*, 1978). Different TSLs systems have been developed in the last two decades with wide variations in their serum stability and temperature sensitivity (Yatvin *et al.*, 1978; Gaber *et al.*, 1995; Gaber *et al.*, 1996; Hossann *et al.*, 2010). Low temperature thermosensitive liposomes (LTSLs) are a category of TSLs based on lysolipids, designed to release their content in tens of seconds as temperature is increased. Apart from their unstability in serum, studies about lysolipid *in vivo* toxicity are lacking (Fuly *et al.*, 2003). Interestingly, Al-Jamal *et al.* (Al-Jamal *et al.*, 2012) have recently showed that TSLs, referred to as traditional thermosensitive liposomes (TTSLs) in the literature, constitute an important alternative to LTSLs owing to their higher serum stability *in vivo*, longer blood circulation and enhanced tumor extravasation after application of HT. Moreover, although the pharmacokinetic (PK) model and the biodistribution (BD) for non thermosensitive liposomes (NTSLs) have been widely studied, little knowledge is available about TSLs.

5-Fluorouracil (5-FU) is a widely used anticancer drug. Many studies have been intended to improve 5-FU half-life by its encapsulation into liposomes (Ozer and Talsma, 1989; Elorza *et al.*, 1993; Fresta *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 2011; Pohlen *et al.*, 2012). Nevertheless, despite optimizations regarding the lipid bilayer composition (Fresta *et al.*, 1993) and/or the drug (Thomas *et al.*, 2011), 5-FU-loaded liposomes have all shown a drug leakage subsequently to intravenous (i.v.) injection and thereby, a short half-life (Kaiser *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2011). We have optimized stealth[®] 5-FU-TSLs (Al Sabbagh *et al.*, 2014) using a ternary

complex with Cu-PEI that should delay drug leakage, and we aim to trigger 5-FU release in tumor upon focused ultrasound (FUS) application. To identify the optimal time for applying FUS on mice bearing HT-29 xenograft tumor, we have compared the PK and BD of a 5-FU solution, 5-FU-loaded stealth[®] TSLs and stealth[®] NTSLs.

2. Materials and methods

2.1. Materials

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC, $T_m = 42^\circ\text{C}$) was purchased from Genzyme (Liestal, Switzerland) and 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-PEG₂₀₀₀ (DSPE-PEG) from Avanti Polar Lipid Inc. (Alabaster, Alabama, USA). Cholesterol (CHOL), 5-Fluorouracil (5-FU, purity $\geq 99\%$), Copper Acetate monohydrate (Cu (II)), polyethylenimine, ethylenediamine branched (PEI, MW = 800 g/mol), phosphate buffer saline (PBS) and hydrogen peroxide 30% solution were obtained from Sigma (St Quentin-Fallavier, France). [2-¹⁴C]-5-FU was supplied by Moravék Biochemicals, Inc. (Brea, California, USA). Hionic-Fluor and Ultima Gold Scintillation fluids and Solvable were purchased from Perkin Elmer (Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA, USA). Sephadex G-50 size exclusion gel was purchased from Pharmacia AB, Laboratory Separation Division (Upssala, Sweden). Solvents used, were of analytical grade. All chemical substances and solvents were used without further purification. Water was purified using a RIOS/Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France).

2.2. 5-FU-loaded liposomes preparation

Two liposomal formulations were produced: TSLs [DPPC/CHOL/DSPE-PEG (90:5:5 mol%)] and NTSLs [DPPC/CHOL/DSPE-PEG (65:30:5 mol%)]. TSLs and NTSLs were prepared by the method described by Bangham *et al.* (Bangham *et al.*, 1965a) followed by extrusion and exclusion-diffusion gel chromatography to remove non-encapsulated compounds. Briefly, lipid mixtures of 0.8 mmol of total lipids, were dissolved into 10 mL of chloroform in a 100 mL round-bottomed flask. The solvent was evaporated to dryness under reduced pressure for 40 min at 45°C to form a thin lipid film. Multilamellar liposomes were formed by rehydration of the lipid film at 50°C with 10 mL of Cu-PEI complex solution (600-417 mM-mM) prepared in 10 mM PBS (138 mM NaCl, pH 7.4) to yield an initial lipid concentration of 80 mM. The resulting mixture was stirred vigorously followed by extrusion, ten times at 60°C , above the transition temperature of DPPC, under nitrogen pressure, between 508 and 871 psi depending on CHOL mol%, through a stack of two 100 nm polycarbonate

filters (Isopore, Millipore, Molsheim, France) as optimized previously (Al Sabbagh *et al.*, 2014). Free complex was separated from liposomes by exclusion-diffusion gel chromatography on a 1×30 cm Sephadex G-50 column pre-equilibrated with a 10 mM PBS (1776 mM dextrose, pH 7.4) and presaturated with unloaded liposomes. Liposomes were then reconcentrated using 0.5 mL Amicon Ultra centrifugal filters (cut-off 100 KDa, Millipore Corporation, Molsheim, France) for 80 min at 14,000 rcf using a tabletop Eppendorf centrifuge 5418 (Hamburg, Germany) to yield liposome concentrates of 80 mM total lipids. Afterwards, reconcentrated liposomes at 80 mM were mixed with a 1665 mM dextrose solution containing 107.6 mM 5-FU (pH 7.4), spiked with ^{14}C -5-FU, at equal volumes to maintain the 5-FU:lipid ratio 53.8 mM:40 mM and incubated at 30°C, 1000 rpm for 24 h as previously optimized (Al Sabbagh *et al.*, 2014). Subsequently, non encapsulated 5-FU was removed using Sephadex G-50 column as described above. Purified liposomes were reconcentrated for *in vivo* experiments using Amicon Ultra centrifugal filters and stored at 4°C for characterization and *in vivo* injection.

2.3. Physico-chemical characterization of 5-FU-loaded liposomes

Mean hydrodynamic diameter (d_H) and polydispersity index (PDI) of purified liposomes were determined using a Malvern Zetasizer Nano ZN (Malvern, UK, He-Ne laser 633 nm) based on quasi-elastic light scattering. Measurements were carried out at 20°C and intensity correlation functions were measured at a scattering angle of 173°. The d_H was obtained from the Stokes-Einstein relation. Viscosity of the suspension was taken into account using tabulated values from the literature.

The ζ -potential of liposomes dispersed in 10 mM PBS (1776 mM dextrose) was measured. Prior to measurements, small aliquots of liposomes (50 μL) were diluted into 950 μL of milliQ water.

The actual phospholipid concentration (DPPC and DSPE-PEG) of the purified liposomes was determined using the Stewart assay (Stewart, 1980) for phospholipids where the ability of phospholipids to form a complex with ammonium ferrothiocyanate in organic solution is utilized. The resulting complex absorbs at 485 nm, thereby absorbance values were determined using a spectrometer (Lambda 25, UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer, USA) and translated into mmol of phospholipid according to a standard curve. Total lipid amount was extrapolated according to the molar ratios of each formula.

The encapsulated 5-FU was determined by measuring the radioactivity using a scintillation counter (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, Beckman Coulter, USA). The drug:lipid ratio was calculated as mmol of encapsulated 5-FU/mmol lipid in the purified liposome according to:

$$\text{drug: lipid} = \frac{\text{Encapsulated 5-FU (mmol)}}{\text{Lipid}_{\text{purified liposomes}} \text{ (mmol)}}$$

The encapsulated amount of Cu was quantified using the property of Cu-PEI complex to exhibit a maxima absorbance peak at 630 nm (Ungaro *et al.*, 2003). 50 μL of purified liposomes were destroyed by adding Triton X-100 (2.5% v/v final concentration) in 2 ml PBS followed by sonication before absorbance reading at 630 nm. A calibration curve at 630 nm of the 600-417 mM-mM complex has served to determine the Cu concentration.

2.4. Animals and tumor model

Female BALB/cAnNRj-Foxn1nu mice (aged 5-6 weeks, 20 g) were purchased from JANVIER LABS (Saint-Berthevin, France). Experiments were conducted according to the European rules (86/609/EEC and 2010/63/EU) and the Principles of Laboratory Animal Care and legislation in force in France (Decree No. 2013-118 of February 1, 2013). Mice were housed in groups of 4 with access to water and food *ad libitum* and kept at a constant temperature (19-22°C) and relative humidity (45-65%). The human colorectal adenocarcinoma cell line HT-29 was obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC, Molsheim, France). HT-29 cells were maintained in McCoy's 5A modified medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 0.5% penicillin/streptomycin at 37°C in humidified air with 5% CO₂ atmosphere. Cells were harvested from 75% confluent monolayer cultures and resuspended with PBS at 10⁷ cells/mL. The colorectal tumor model was established by subcutaneous inoculation of 1 \times 10⁶ HT-29 cells in a volume of 100 μL of PBS into the right flank of the animal using 21G needles. The tumor volume was estimated by measuring two diameters with caliper; the volume was calculated as = 0.5 length (mm) \times width (mm)² (Figure 1). The experiments were performed when the tumor volume reached 150-250 mm³.

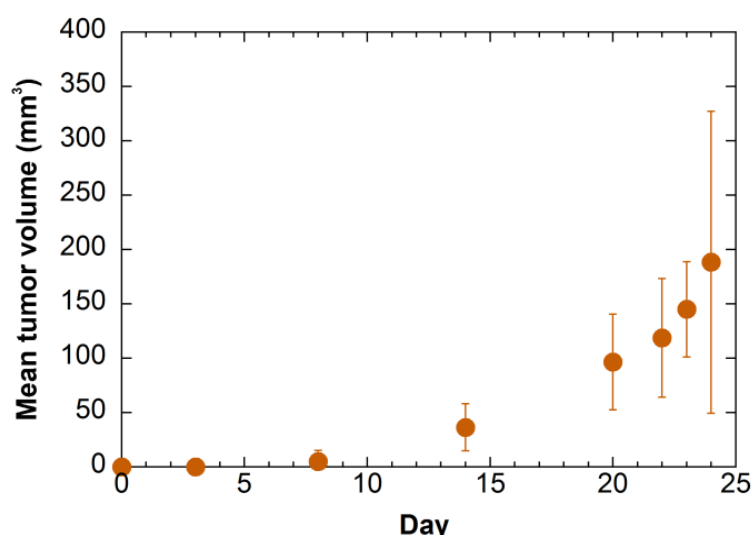


Figure 1. Growth curve of subcutaneous HT-29 tumor cells in the right flank of female mice.

2.5. Pharmacokinetic study in tumor-bearing mice

Mice were randomly separated into 4 mice per group. 5-FU-TSLs, 5-FU-NTSLs or free 5-FU (corresponding to 22 mg 5-FU/kg body weight, 1 μCi ^{14}C /150 μL , ~ 232 mg of lipids/Kg body weight) in PBS (888 mM dextrose, pH 7.4) were injected to tumor-bearing mice via tail vein injection (i.v.) using an injection volume of 150 μL /mouse. All the injected formulations were administered in dextrose medium (888 mM). At specified time points (5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h) after the injection, the mouse (4 animals for each time point) was anesthetized with pentobarbital (109 mg/Kg body weight, injected intraperitoneally), blood was withdrawn via cardiac puncture (500-900 μL) and the mouse was humanely sacrificed immediately after. Blood was collected into tubes containing 100 μL of sodium citrate and plasma was immediately separated from blood cells by centrifugation at room temperature for 20 min at 3,000 rpm and stored at -20°C until analysis. Afterward, for each time point, plasma samples were thawed and duplicated into two 20 mL scintillation vials (150 μL /vial). The plasma level of 5-FU was quantified by adding 10 mL of the scintillation fluid Ultima Gold followed by measuring ^{14}C radioactivity.

2.6. Biodistribution study in tumor-bearing mice

Biodistribution (BD) of the three formulations mentioned in section 2.5. was followed only at time points 4 and 24 h after injection since liposomes exhibit a cumulative deposition in organs at earlier time points (Papahadjopoulos *et al.*, 1991; Al-Jamal *et al.*, 2012). After blood withdrawal, lungs, liver, spleen, kidneys, tumor and bone marrow were then excised and mouse was humanely sacrificed subsequently. The tissues samples were washed free of blood in

isotonic saline solution and weighed after removing the excess of fluid. Two pieces of each organ of approximately 100 to 150 mg were minced and transferred into small pouches. Femur was removed and cleaned; bone marrow was flushed with 0.5 mL of isotonic saline solution, through 26G needle and syringe. The femur was weighed before and after the flushing as a control of the bone marrow weight. Subsequently, all organs were kept at -20°C before measuring the radioactivity distribution. To quantify the tissular level of 5-FU, frozen organs parts were transferred into 20 mL scintillation vials and thawed at room temperature. Subsequently, organs were solubilized with 1 mL of Solvable and incubated overnight at 50 to 60°C. After solubilization was completed, 200 µL of 30% hydrogen peroxide was added to uncolour samples with an incubation at 50 to 60°C for 30 min. Afterwards, samples were cooled down and 10 mL of the scintillation fluid Hionic Fluor was added and were then counted for ¹⁴C radioactivity. Radioactivity in bone marrow was quantified by thawing corresponding samples, transferring the whole volume into two 20 mL scintillation vials (250 µL/vial) and adding 10 mL of the scintillation fluid Ultima Gold. Control samples (5-FU-TSLs, 5-FU-NTSLs or free 5-FU) were run together with the corresponding mouse samples in duplicate. The results were represented as the quantity of 5-FU (µg) per gram organ.

2.7. Pharmacokinetics evaluation

Curve modeling was performed according to non compartmental model. The PK parameters including distribution half-life ($t_{1/2\alpha}$) in h, elimination half-life ($t_{1/2\beta}$) in h, peak concentration C_{\max} in µmol.L⁻¹, time corresponding to peak concentration T_{\max} in h, area under the concentration-time curve (AUC_{0-4h} , AUC_{0-24h} and $AUC_{0-\infty}$) in µmol.h.L⁻¹ and plasmatic clearance in L.h⁻¹ were calculated.

2.8. Statistical analysis

All results are expressed as the mean ± standard deviation. Statistical analysis was performed with the two way ANOVA, followed by Tukey's (formulations comparison) or Sidak (organs or time point comparison) multiple comparison test by using GraphPad Prism version 6.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). A difference with $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results and discussion

Before, exploiting 5-FU-TSLs as temperature activable drug delivery systems, their PK and BD have been evaluated after i.v. injection and compared to 5-FU in NTSL and free 5-FU.

3.1. Formulation and characterization of 5-FU-TSLs and 5-FU-NTSLs

Table 1 summarizes physicochemical properties of TSLs and NTSLs encapsulating 5-FU. The hydrodynamic diameter d_H is around 65 nm for TSLs and around 100 nm for NTSLs with PDIs below 0.1 therefore ensuring a rather narrow size distribution. As observed previously (Al Sabbagh *et al.*, 2014), as the percentage of CHOL increases from 5 (TSLs) to 30% (NTSLs) for a given 5-FU:lipid ratio, d_H increases in consequence to the higher rigidity of the lipid bilayer. According to literature, we standardized liposome size to be smaller than 100 nm, to ultimately enhance liposome blood half-life (Phan *et al.*, 2005) and intratumoral liposomal drug accumulation by liposome extravasation through tumor microvasculature (Kong *et al.*, 2000; Maillard *et al.*, 2005). Several groups demonstrated that the smaller the liposomes the better the transport across the vessels wall and that 100 nm liposomes extravasate much easier than 200 or 400 nm liposomes (Kong *et al.*, 2000). Moreover, small liposomes can diffuse better through tumor tissue to avoid limited perivascular accumulation (Yuan *et al.*, 1994). For intracellular delivery, the internalization of liposomes is faster for small liposomes than for larger liposomes (Decuzzi *et al.*, 2009).

Zeta potential value of TSLs is slightly negative (-10.2 mV) while NTSLs are rather neutral (-4.9 mV) (Table 1). This slight difference could arise from an adsorption of positively charged PEI at physiologic or acid pH onto the surface of NTSLs more than onto TSLs (Al Sabbagh *et al.*, 2014). Liposome surface charge affects their clearance by the reticuloendothelial system (RES): the larger the surface charge (either positive or negative) the more important the interactions with the RES that leads to greater clearance of liposomes. TSLs and NTSLs possess a slightly negative surface charge due to PEG chains that confer steric stabilization and prevent opsonization by serum proteins and phagocytosis by Kupffer cells (Phan *et al.*, 2005). Moreover, neutral liposomes diffuse faster and distribute more homogeneously inside the tumor interstitial space than cationic and anionic liposomes, because the latter form aggregates with negatively charged (e.g. hyaluronan) or positively charged (e.g. collagen) matrix molecules (Liegler *et al.*, 2009).

For both formulations the 5-FU:lipid ratio is similar around 1:2 (Table 1) yielding an encapsulated 5-FU concentration of 2.5 mg 5-FU/mL. The 5-FU:Cu ratio is similar in all cases around 1:1 indicating that one Cu ion interacts with one molecule of 5-FU forming a

coordination complex. Finally, the Cu:lipid ratio is also approximately 1:2 for the TSL formulation and slightly larger between 1.2:2 and 1.4:2 for the NTSLs. On one hand, this ensures an equal load for each suspension injected *in vivo* under the same volume, and on the other hand, the elimination of disparity in the biodistribution due to different lipid concentration between formulations. It is expected to obtain a greater drug encapsulation in larger liposomes (NTSLs), which might lead to higher content release (Al-Jamal *et al.*, 2012). Nevertheless, despite the disparity in size, our two liposomal formulations disclose an identical drug encapsulation efficacy.

Table 1. Physicochemical properties of 5-FU-TSLs and 5-FU-NTSLs. Samples were diluted in 10 mM PBS + 1776 mM dextrose prior to size measurement and in deionized water for zeta potential measurement (n = 3).

Formulation	Composition CHOL (mol%)	d _H (nm) (mean ± SD)	PDI (mean ± SD)	ζ-potential (mV) (mean ± SD)	5-FU:lipid ratio (mmol:mmol)	5-FU:Cu ratio (mmol:mmol)	Cu:lipid ratio (mmol:mmol)
5-FU-TSLs	5	65 ± 4	0.09 ± 0.01	-10.2 ± 5.2	1.04:2	1.02:1	1.02:2
5-FU-NTSLs	30	105 ± 8	0.06 ± 0.01	-4.9 ± 4.1	1.12:2	0.92:1	1.22:2

3.2. Pharmacokinetics of 5-FU

The plasmatic concentration of 5-FU after administration of 5-FU-TSLs, 5-FU-NTSLs and free 5-FU solution, was determined in tumor-bearing mice. The PK profiles are depicted in Figure 2A. From PK profiles the major PK parameters were calculated (Table 2). The maximum detected plasma concentration C_{max} of 5-FU solution, 5-FU-TSLs and 5-FU-NTSLs were 54 µmol.L⁻¹ at 0.25 h, 75 µmol.L⁻¹ at 0.5 h and 84 µmol.L⁻¹ at 0.25 h post injection, respectively. These C_{max} values are of the same order of magnitude and occur approximately at the same T_{max}. Although formulations were administered intravenously, the maximum concentration does not occur immediately due to two reasons: first the injection site (tail vein) differs from the sampling site (cardiac puncture), second formulations were administered in dextrose at a high concentration leading to a high viscosity, therefore delaying their dilution in the bloodstream.

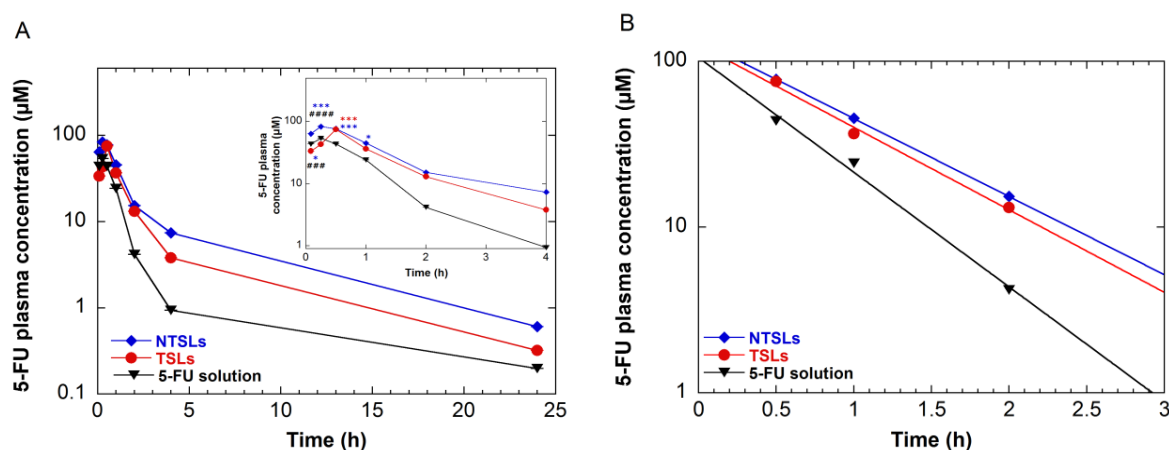


Figure 2. A) Plasma kinetics of 5-FU-TSLs, 5-FU-NTSLs and 5-FU solution. 5-FU was intravenously administered (22 mg 5-FU/kg body weight) into tumor-bearing mice. 5-FU plasma concentration (μM) is plotted. The blood clearance can be described with a biexponential time dependence. B) Fitting of 5-FU concentration in plasma over the distribution phase. Data points and error bars are the average and standard deviation of the four mice. *, $p \leq 0.05$, ***, $p \leq 0.001$, significant difference compared to free 5-FU solution. ###, $p \leq 0.001$, ####, $p \leq 0.0001$, significant difference for liposomal formulations compared to each other.

Table 2. Pharmacokinetics parameters for 5-FU when administered intravenously as solution, TSLs and NTSLs. All formulations were injected at 22 mg 5-FU/kg body weight into tumor-bearing mice.

PK parameter	5-FU solution	5-FU-TSLs	5-FU-NTSLs
C_{\max} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	54	75	84
T_{\max} (h)	0.25	0.5	0.25
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.44	0.6	0.64
$t_{1/2\beta}$ (h)	9	5.59	5.55
AUC_{0-4h} ($\mu\text{mol.h.L}^{-1}$)	56	91	116
AUC_{0-24h} ($\mu\text{mol.h.L}^{-1}$)	68	132	196
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{mol.h.L}^{-1}$)	71	135	201
Clearance (L.h^{-1})	0.046	0.025	0.017

After reaching their maximum concentration, drug levels decreased down to 0.2, 0.32 and 0.6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectively at 24 h (Figure 2A). The drug plasmatic concentration decrease can be described with a biexponential time dependence. The first characteristic time corresponds to a rapid initial distribution phase and the second characteristic time corresponds to a slower elimination phase (Figure 2A and 2B). The initial phase corresponds to a reversible distribution between the central and peripheral compartments. The second phase corresponds to an irreversible elimination from the central compartment via urinary excretion and/or hepatic

biotransformation. The distribution phase of 5-FU administered in TSLs and NTSLs is longer than 5-FU administered as a solution in dextrose (Figure 2B). A longer distribution half-life ($t_{1/2\alpha}$) of approximately 36 min (i.e. 0.6 h) is observed for both types of liposomes, whereas $t_{1/2\alpha} = 26$ min (i.e. 0.44 h) for the 5-FU solution (Figure 2B). This confirms that liposome formulation circulate longer than the free drug. Values obtained for 5-FU solution are different from those obtained for 5-FU solution injected in saline for which the apparent distribution half-life was 12.9 ± 7.3 min (non-compartmental analysis) (Heggie *et al.*, 1987). The longer distribution half-life of 5-FU obtained here could arise from the concentrated dextrose medium in which 5-FU is injected.

Concerning the elimination phase, 5-FU elimination is longer when administered as a solution with $t_{1/2\beta} = 540$ min (i.e. 9 h) than when administered as liposomes $t_{1/2\beta} = 336$ min (i.e. 5.6 h). The elimination half-life of free 5-FU is probably longer since the free molecule does not interact with the immune system whereas liposomes may be opsonized, phagocytosed and should finally accumulate in the reticuloendothelial organs. The elimination pathways for free 5-FU and liposome-encapsulated 5-FU are probably different.

The AUC_{0-24h} was calculated for all formulations. On one hand, the AUC_{0-24h} of free 5-FU was $68 \mu\text{mol.h.L}^{-1}$. On the other hand, liposomes formulations lead to higher values: 132 and $196 \mu\text{mol.h.L}^{-1}$ for TSLs and NTSLs, respectively. These AUC values are significantly different ($p \leq 0.05$). AUC_{0-24h} was not different than AUC_{0-4h} for 5-FU solution indicating that 5-FU is already cleared within the first 4 h post injection, and thereby, beyond 4 h, 5-FU plasma concentration does not contribute to the exposure of the organism to the drug. While, for 5-FU-loaded liposomes, AUC_{0-24h} was different than AUC_{0-4h} showing that even during elimination phase 5-FU contributes to the whole body exposure. One should also note that values of AUC_{0-24h} were not different than $AUC_{0-\infty}$ values, meaning that 24 h experiment is sufficient to assess 5-FU PK. Overall, as expected, liposomes lead to a prolonged exposition to 5-FU as compared to free drug. PEGylation was indeed efficient to promote liposome circulation. The difference between TSLs and NTSLs probably arises from their CHOL content: as shown in the literature (Gaber *et al.*, 1995; Semple *et al.*, 1996; Needham and Dewhirst, 2001) liposomes containing 30% CHOL are more stable in the bloodstream than those containing a lower concentration of CHOL. Clearance values are in agreement with previous findings with 5-FU being cleared faster when administered as a free molecule as compared with TSLs which are in turn cleared slightly faster than NTSLs (Table 2). Although literature is abundant in different liposomes formulations of 5-FU, scarce data is reported about their PK. Thomas *et al.* (Thomas *et al.*, 2011) performed a PK study on non-PEGylated liposomes but did not calculate any PK

parameters. Jin *et al.* (Jin *et al.*, 2005) evaluated the PK of galactosylceramide liposomes encapsulating 5-FU and found a shorter distribution half-life of 28 min and a 3 to 5-fold lower AUC of 38 $\mu\text{mol.h.L}^{-1}$. Our TSLs and NTSLs formulations are therefore better in terms of exposure. The difference of AUCs and distribution half-lives between the free drug and the liposomes are not as impressive as what has been observed with Doxil[®], however, in our case, 5-FU is not trapped in a gel-phase, which could be a benefit for release upon HT.

3.3. Biodistribution of 5-FU

In addition to the PK, 5-FU BD was also determined at 4 and 24 h after administration (Figure 3). In the tumor, 5-FU concentration is around 0.5 $\mu\text{g/g}$ tumor at 4 h when administered either free or in TSLs, and around 1 $\mu\text{g/g}$ tumor when administered as NTSLs (* $p \leq 0.05$) (Figure 3A). This increase was likely due to passive tumor targeting (Enhanced permeation and retention EPR effect) due to the prolonged circulation of NTSLs as compared with the other formulations. Although TSLs circulate longer than the free drug, there was no significant difference in 5-FU accumulation in tumor at 4 h. This confirms the higher stability of NTSLs compared to TSLs. Indeed, according to PK results (Figure 2A), at 1 h post injection, there was no significant difference in 5-FU plasmatic concentration between 5-FU-TSLs and 5-FU solution, while 5-FU concentration was significantly higher than 5-FU solution by a factor 1.9 (* $p < 0.05$) in the case of 5-FU-NTSLs. This suggests a progressive release of 5-FU between 0.5 and 1 h following administration of 5-FU-TSLs whilst 5-FU-NTSLs remain stable. In our case, 5-FU leakage from 5-FU-TSLs could be due to a low serum stability of TSLs, composed of a low concentration of CHOL (5 mol%), in contact with blood components compared to 5-FU-NTSLs containing 30 mol% of CHOL (Gaber *et al.*, 1995; Semple *et al.*, 1996; (Gaber *et al.*, 1995; Semple *et al.*, 1996; Needham and Dewhirst, 2001). At 24 h post-injection, 5-FU concentration decreased and was not significantly different between the three groups. Drug concentration was also measured in the different organs of the reticuloendothelial system (RES): bone marrow, liver, spleen, lungs and the kidneys to assess excretion.

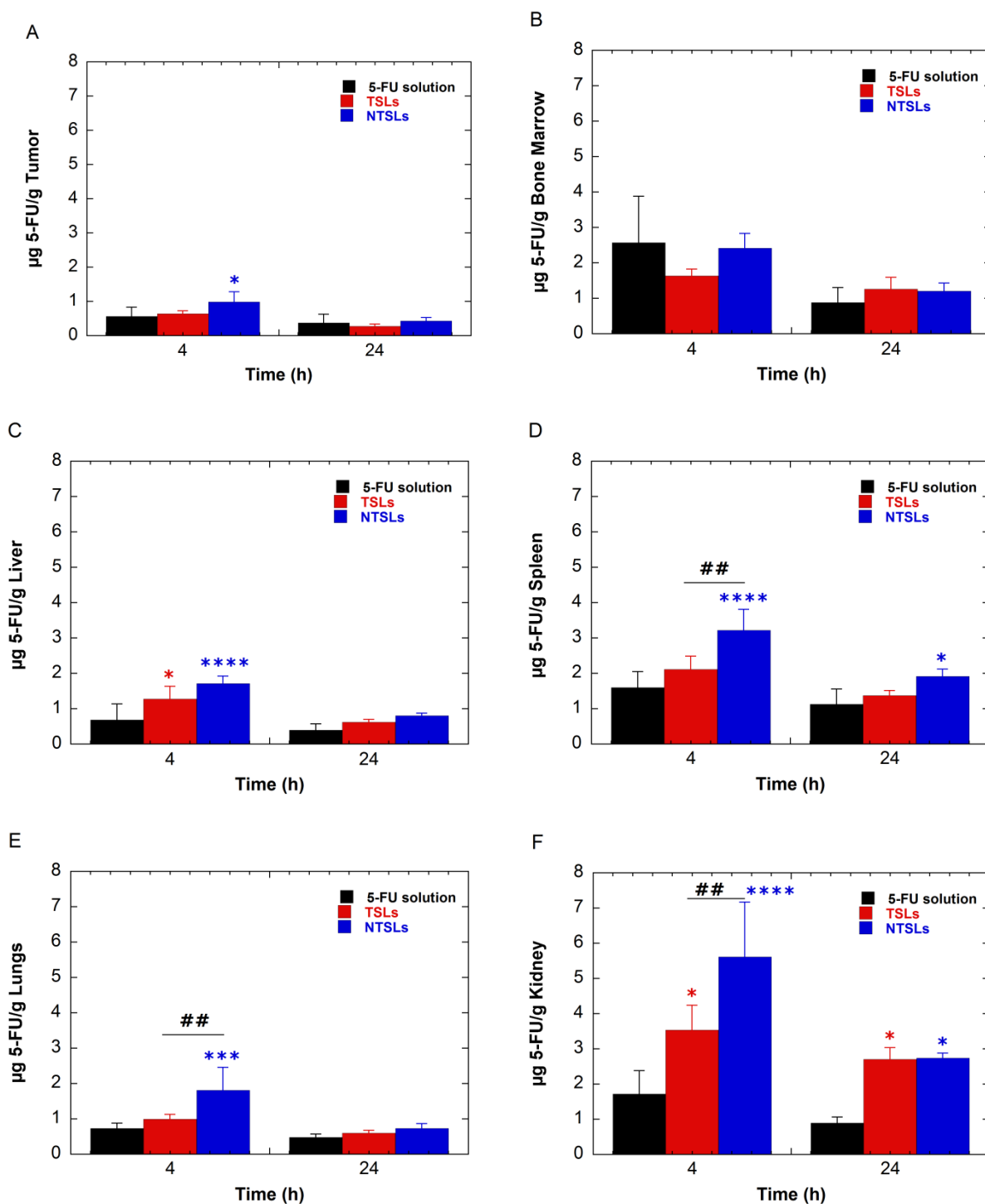


Figure 3. Biodistribution of 5-FU at 4 h and 24 h after intravenous administration of 5-FU (22 mg 5-FU/kg body weight) in different formulations into tumor-bearing mice. Data points and error bars are the average and standard deviation of the four mice. *, $p \leq 0.05$, ***, $p \leq 0.001$, ****, $p \leq 0.0001$, significant difference compared to free 5-FU solution at a definite time point. #, $p \leq 0.01$, significant difference compared to the second liposomal formulation at the same time point.

The 5-FU concentration in bone marrow at 4 h was identical irrespective to the administered formulation (Figure 3B). The same finding was observed at 24 h but the overall 5-FU concentration in the bone marrow was lower. In the liver, 4 h after injection, as expected, 5-FU concentration was higher by a factor 2.6 (**** $p \leq 0.0001$) and 1.9 (* $p \leq 0.05$), for NTSLs and TSLs groups respectively, compared to free 5-FU (Figure 3C). There was no significant difference between 5-FU-loaded liposomes liver capture at 4 h proving their stealthiness is identical. 24 h post-injection, 5-FU concentration are not significantly different between the 3 groups. In the spleen, 4 h post-injection, 5-FU concentration was not significantly different between TSLs and free 5-FU, while NTSLs leads to a 2-fold increase (**** $p \leq 0.0001$) of 5-FU concentration in the spleen compared to free 5-FU (Figure 3D). Despite their long circulation, NTSLs are better recognized than TSLs by spleen macrophages. Splenic uptake is often compared to a filtering or a sieving process, particularly effective to remove poorly opsonized antigens, therefore it does not depend on the nanoparticles surface properties (Slatter, 2003). The spleen uptake of 5-FU-NTSLs compared to 5-FU-TSLs at 4 h is significantly higher by 1.5-fold (^{##} $p \leq 0.01$) in agreement with previous published data (Al-Jamal *et al.*, 2012). Schroit *et al.* report that CHOL increases the uptake of PC liposomes by the RES (Schroit *et al.*, 1986). 24 h post-injection, 5-FU concentration globally decreases and is similar for free drug and TSLs and slightly greater for NTSLs (* $p \leq 0.05$).

In the lungs, 4 h post-injection, 5-FU concentration does not differ between free 5-FU and 5-FU-TSLs (Figure 3E). However, 5-FU-NTSLs leads to a 2-fold higher concentration compared to the other groups (^{##} $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$, respectively). Despite this observation, one should note that lung accumulation of 5-FU (solution or liposomes) is significantly ($p \leq 0.05$) lower compared to spleen uptake regardless from the formulation and the time point. These results indicate that lung accumulation is not related to liposome aggregation. The greater accumulation of NTSLs may arise from their larger size and higher rigidity (Schroit *et al.*, 1986). 24 h post-injection, 5-FU concentration in the lungs is similar for the 3 groups.

In the kidneys, 4 h post-injection, 5-FU concentration is higher (* $p \leq 0.05$) for 5-FU-TSLs than for free 5-FU and even more important (**** $p \leq 0.0001$) for 5-FU-NTSLs (Figure 3F). This trend is further confirmed 24 h post-injection with 5-FU concentrations in kidneys more important for liposome formulation than for the free drug. Indeed, this is in agreement with data that reports a short plasmatic half-life of 5-FU after i.v. bolus administration in patients and animals of approximately 10-15 min due to a clearance from plasma in 1 h as a consequence of a very rapid metabolism by the enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase or uracil reductase

(Chadwick and Rogers, 1972; MacMillan *et al.*, 1978; Heggie *et al.*, 1987). In fact, it has been reported that approximately 60-90% of the administered dose of 5-FU is excreted in urine within 24 h, primarily as alpha-fluoro-beta-alanine, that biliary excretion accounted for 2-3% of total administered dose. Furthermore, 10% of the injected dose is excreted unchanged by urine (Alvarez *et al.*, 2012). Therefore, free 5-FU concentration in kidneys at 4 h corresponds to the small amount that remains in blood during the elimination phase, and does not constitute a relevant comparison with 5-FU liposomes. Regarding liposome formulations, the significant difference ($^{##}p \leq 0.01$), in 5-FU concentration in kidney at 4 h, between 5-FU-TSLs and 5-FU-NTSLs probably arises from the lower serum stability of TSLs compared to NTSLs, that induces an earlier 5-FU leakage in blood. Therefore, renal excretion of 5-FU that leaked out from both formulations could start at different times, attaining, thus, a shifted renal clearance peaks, more probably before 4 h. A renal clearance kinetic would have demonstrated this assumption. On the other hand, in order to assess whether this significant lag was due to 5-FU leakage from liposomes in blood or, due to a specific targeting of different CHOL-containing liposomes (different affinity to kidney tissue), dual labeled liposomes should have been followed by measuring the 5-FU:lipids ratio over time in plasma and kidney and compared to the ratio at the initial time point.

Moreover, comparing liver and spleen uptake, 5-FU splenic uptake, regardless from the formulation, is significantly greater ($p \leq 0.05$) compared to liver uptake at 4 and 24 h (Figures 3C, 3D). This is consistent with previous data that showed a preferable spleen uptake of TSLs and NTSLs compared to liver uptake (Al-Jamal *et al.*, 2012). The elimination of 5-FU by the liver and spleen occurs over time leading to a decrease in 5-FU concentrations in both organs at 24 h compared to 4 h, irrespective to the injected formulation. BD of liposomes is critical to identify any potential organ toxicity following their administration and accumulation in tissues. As suggested for other liposomes, drugs sequestered within RES tissues may not be in diffusional equilibrium with the plasma compartment, so that some of the 5-FU in the 5-FU-TSLs or 5-FU-NTSLs may be eliminated from the tissue compartment rather than from the central compartment.

In summary, a rapid clearance of free 5-FU is observed, while encapsulated 5-FU benefits from an extended blood circulation. Liposomes were taken up by the RES organs especially spleen and liver, and at less extent by bone marrow and lungs. The highest tumor accumulation was obtained for the longest blood circulating 5-FU-NTSLs, while a moderate increase in tumor accumulation was seen for the 5-FU-TSLs (Figure 3A). This finding was thought to be due to the highest serum stability of 5-FU-NTSLs compared to 5-FU-TSLs. Indeed, following serum

destabilization, the encapsulated 5-FU is released in the bloodstream and thus cleared rapidly, hindering thereby additional tumor accumulation. The biphasic elimination pattern of both liposomes formulations could suggest that a fraction of the loaded drug is released following injection and that the fraction of 5-FU that remains entrapped into liposomes is represented in the second elimination phase. The spleen, liver, bone marrow and lung accumulation of liposomes, in addition to the likely leakage of the encapsulated 5-FU in bloodstream, combined to the significant renal concentration of 5-FU could account for the reduction in both blood circulation and tumor uptake of 5-FU-TSLs and 5-FU-NTSLs as shown in Figures 2 and 3, respectively. Finally, 5-FU-TSLs and 5-FU-NTSLs with different CHOL molar percentage presented slightly different plasma kinetics and organ distribution. Thus, our results show that liposome composition dramatically affects their stability *in vivo*, and thereby their fate in agreement with published works (Al-Jamal *et al.*, 2012).

4. Conclusion

We have administered intravenously two optimized formulations of 5-FU-loaded TSLs and 5-FU-loaded NTSLs in HT-29 tumor-bearing mice and we have demonstrated improved PK and BD of the anticancer drug 5-FU at short time points compared to the free drug solution. Both TSLs and NTSLs exhibited a longer blood circulation but only NTSLs improved 5-FU accumulation in tumor. The serum stability of both formulations *in vivo* and their stealthiness are worth investigating in the future. In addition, the renal accumulation of both 5-FU-TSLs and 5-FU-NTSLs is worth further studies to determine if 5-FU is free, complexed with Cu-PEI or encapsulated in liposomes. NTSLs showed higher spleen uptake compared to TSLs, further work is needed to understand why high CHOL-containing liposomes are more captured by the RES. The results presented here are promising to expand the research efforts in the TSLs combined to FUS approach. On the basis of the present PK, we designed our FUS-mediated HT protocol to evaluate the anti-tumor efficacy of 5-FU-TSLs. HT will be applied 30 min post injection, when the plasma level of 5-FU is around 80 to 100% of the maximal 5-FU concentration detected in plasma, and the 5-FU is still entrapped into liposomes.

Acknowledgments

This research work was funded by Agence Nationale de la Recherche (ANR-2010-TecSan-007). Institut Galien Paris-Sud is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33). Authors would like to thank A. Maximenko for help with tumor model development, and H. Bénech for help with PK analysis.

Références

- Agarwal, A., Mackey, M. A., El-Sayed, M. A. and Bellamkonda, R. V. (2011). "Remote Triggered Release of Doxorubicin in Tumors by Synergistic Application of Thermosensitive Liposomes and Gold Nanorods." ACS Nano 5(6): 4919-4926.
- Al-Jamal, W. T., Al-Ahmady, Z. S. and Kostarelos, K. (2012). "Pharmacokinetics & tissue distribution of temperature-sensitive liposomal doxorubicin in tumor-bearing mice triggered with mild hyperthermia." Biomaterials 33(18): 4608-4617.
- Al Sabbagh, C., Novell, A., Escoffre, J.-M., Gaillard, C., Tsapis, N., Fattal, E. and Bouakaz, A. (2014). "In-vitro evaluation of focused ultrasound-mediated thermal and mechanical effects on the calcein release from temperature-sensitive liposomes." Submitted.
- Al Sabbagh, C., Novell, A., Tsapis, N., Escoffre, J.-M., Bouakaz, A., Chacun, H., Denis, S., Vergnaud, J., Gueutin, C. and Fattal, E. (2014). "5-Fluorouracil encapsulation into thermosensitive stealth® liposomes for triggered delivery." Submitted.
- Alvarez, P., Marchal, J. A., Boulaiz, H., Carrillo, E., Velez, C., Rodriguez-Serrano, F., Melguizo, C., Prados, J., Madeddu, R. and Aranega, A. (2012). "5-Fluorouracil derivatives: a patent review." Expert Opinion on Therapeutic Patents 22(2): 107-123.
- Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C. (1965a). "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids." Journal of Molecular Biology 13(1): 238-252.
- Chadwick, M. and Rogers, W. I. (1972). "Physiological disposition of 5-Fluorouracil in mice bearing solid L1210 lymphocytic leukemia." Cancer Research 32(5): 1045-&.
- de Smet, M., Heijman, E., Langereis, S., Hijnen, N. M. and Groll, H. (2011). "Magnetic resonance imaging of high intensity focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: An in vivo proof-of-concept study." Journal of Controlled Release 150(1): 102-110.
- Decuzzi, P., Pasqualini, R., Arap, W. and Ferrari, M. (2009). "Intravascular Delivery of Particulate Systems: Does Geometry Really Matter?" Pharmaceutical Research 26(1): 235-243.
- Elorza, B., Elorza, M. A., Frutos, G. and Chantres, J. R. (1993). "Characterization of 5-Fluorouracil loaded liposomes prepared by reverse-phase evaporation or freezing-thawing extrusion methods - Study of drug-release " Biochimica Et Biophysica Acta 1153(2): 135-142.
- Fresta, M., Villari, A., Puglisi, G. and Cavallaro, G. (1993). "5-Fluorouracil: various kinds of loaded liposomes: encapsulation efficiency, storage stability and fusogenic properties." International Journal of Pharmaceutics 99(2-3): 145-156.
- Fuly, A. L., Calil-Elias, S., Martinez, A. M. B., Melo, P. A. and Guimarães, J. A. (2003). "Myotoxicity induced by an acidic Asp-49 phospholipase A2 isolated from Lachesis muta snake venom: Comparison with lysophosphatidylcholine." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 35(10): 1470-1481.

Gaber, M. H., Hong, K. L., Huang, S. K. and Papahadjopoulos, D. (1995). "Thermosensitive sterically stabilized liposomes - Formulation and in-vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma." Pharmaceutical Research 12(10): 1407-1416.

Gaber, M. H., Wu, N. Z., Hong, K. L., Huang, S. K., Dewhirst, M. W. and Papahadjopoulos, D. (1996). "Thermosensitive liposomes: Extravasation and release of contents in tumor microvascular networks." International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 36(5): 1177-1187.

Grüll, H. and Langereis, S. (2012). "Hyperthermia-triggered drug delivery from temperature-sensitive liposomes using MRI-guided high intensity focused ultrasound." Journal of Controlled Release 161(2): 317-327.

Heggie, G. D., Sommadossi, J.-P., Cross, D. S., Huster, W. J. and Diasio, R. B. (1987). "Clinical Pharmacokinetics of 5-Fluorouracil and Its Metabolites in Plasma, Urine, and Bile." Cancer Research 47(8): 2203-2206.

Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M. and Jain, R. K. (1997). "Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation." Nature Medicine 3(2): 177-182.

Hossann, M., Wang, T., Wiggenhorn, M., Schmidt, R., Zengerle, A., Winter, G., Eibl, H., Peller, M., Reiser, M., Issels, R. D. and Lindner, L. H. (2010). "Size of thermosensitive liposomes influences content release." Journal of Controlled Release 147(3): 436-443.

Jin, Y., Li, J., Rong, L. F., Lu, X. W., Huang, Y. and Xu, S. Y. (2005). "Pharmacokinetics and tissue distribution of 5-fluorouracil encapsulated by galactosylceramide liposomes in mice." Acta Pharmacol Sin 26(2): 250-256.

Kaiser, N., Kimpfler, A., Massing, U., Burger, A. M., Fiebig, H. H., Brandl, M. and Schubert, R. (2003). "5-Fluorouracil in vesicular phospholipid gels for anticancer treatment: entrapment and release properties." International Journal of Pharmaceutics 256(1-2): 123-131.

Kong, G., Braun, R. D. and Dewhirst, M. W. (2001). "Characterization of the Effect of Hyperthermia on Nanoparticle Extravasation from Tumor Vasculature." Cancer Research 61(7): 3027-3032.

Kong, G., Braun, R. D. and Dewhirst, M. W. (2000). "Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: Effect of particle size." Cancer Research 60(16): 4440-4445.

Kong, G. and Dewhirst, M. W. (1999). "Hyperthermia and liposomes." International Journal of Hyperthermia 15(5): 345-370.

Lieleg, #160, Oliver, Baumg, #196, Rtel, M., R., Bausch and R., A. (2009). Selective Filtering of Particles by the Extracellular Matrix: An Electrostatic Bandpass. Cambridge, MA, ETATS-UNIS, Cell Press.

MacMillan, W. E., Wolberg, W. H. and Welling, P. G. (1978). "Pharmacokinetics of Fluorouracil in Humans." Cancer Research 38(10): 3479-3482.

Maillard, S., Ameller, T., Gauduchon, J., Gougelet, A., Gouilleux, F., Legrand, P., Marsaud, V., Fattal, E., Sola, B. and Renoir, J.-M. (2005). "Innovative drug delivery nanosystems

improve the anti-tumor activity in vitro and in vivo of anti-estrogens in human breast cancer and multiple myeloma." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 94(1-3): 111-121.

Needham, D., Anyarambhatla, G., Kong, G. and Dewhirst, M. W. (2000). "A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: Characterization and testing in a human tumor xenograft model." Cancer Research 60(5): 1197-1201.

Needham, D. and Dewhirst, M. W. (2001). "The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors." Advanced Drug Delivery Reviews 53(3): 285-305.

Ozer, A. Y. and Talsma, H. (1989). "Preparation and stability of liposomes containing 5-fluorouracil." International Journal of Pharmaceutics 55(2-3): 185-191.

Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S. K., Lee, K. D., Woodle, M. C., Lasic, D. D. and Redemann, C. (1991). "Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy." Proceedings of the National Academy of Sciences 88(24): 11460-11464.

Park, S. M., Kim, M. S., Park, S.-J., Park, E. S., Choi, K.-S., Kim, Y.-s. and Kim, H. R. (2013). "Novel temperature-triggered liposome with high stability: Formulation, in vitro evaluation, and in vivo study combined with high-intensity focused ultrasound (HIFU)." Journal of Controlled Release 170(3): 373-379.

Phan, G., Herbet, A., Cholet, S., Benech, H., Deverre, J. R. and Fattal, E. (2005). "Pharmacokinetics of DTPA entrapped in conventional and long-circulating liposomes of different size for plutonium decorporation." J Control Release 110(1): 177-188.

Pohlen, U., Buhr, H., Berger, G., Ritz, J.-P. and Holmer, C. (2012). "Hepatic arterial infusion (HAI) with PEGylated liposomes containing 5-FU improves tumor control of liver metastases in a rat model." Investigational New Drugs 30(3): 927-935.

Schroit, A. J., Madsen, J. and Nayar, R. (1986). "Liposome-cell interactions - invitro discrimination of uptake mechanism and invivo targeting strategies to mononuclear phagocytes." Chemistry and Physics of Lipids 40(2-4): 373-393.

Semple, S. C., Chonn, A. and Cullis, P. R. (1996). "Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes." Biochemistry 35(8): 2521-2525.

Slatter, D. (2003). Textbook of small animal surgery. USA, Elsevier Science.

Stewart, J. C. M. (1980). "Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate." Analytical Biochemistry 104(1): 10-14.

Thomas, A. M., Kapanen, A. I., Hare, J. I., Ramsay, E., Edwards, K., Karlsson, G. and Bally, M. B. (2011). "Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-Fluorouracil for parenteral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy." Journal of Controlled Release 150(2): 212-219.

Ungaro, F., De Rosa, G., Miro, A. and Quaglia, F. (2003). "Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 31(1): 143-149.

Yatvin, M. B., Weinstein, J. N., Dennis, W. H. and Blumenthal, R. (1978). "Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia." Science 202(4374): 1290-1293.

Yuan, F., Leunig, M., Huang, S. K., Berk, D. A., Papahadjopoulos, D. and Jain, R. K. (1994). "Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (Stealth) liposomes in a human tumor xenograft." Cancer Research 54(13): 3352-3356.

Encapsulation du 5-FU par la technique de congélation/décongélation

1. Introduction

Le 5-FU est un PA anticancéreux prescrit dans le traitement de différents types de cancers grâce à son spectre d'activité antitumorale très étendu. La demi-vie plasmatique courte, le métabolisme rapide, la variabilité interindividuelle ainsi que la résistance cellulaire au traitement font de lui un très bon candidat pour une forme vectorisée. Pour cette raison, l'encapsulation du 5-FU à l'intérieur des liposomes a suscité un grand intérêt dans le domaine de la vectorisation. Les propriétés physico-chimiques du PA définissent souvent le choix de la technique d'encapsulation qui, à son tour, détermine certaines caractéristiques des liposomes formés telles que la taille, la structure et surtout l'EE. Dans le cas du 5-FU, la technique d'encapsulation souvent utilisée est l'encapsulation passive décrite par Alec Bangham en 1965 (Bangham *et al.*, 1965a) dite aussi technique d'hydratation du film lipidique (Glavas-Dodov *et al.*, 2005).

En utilisant cette technique, l'EE varie entre 2 et 25% en fonction de la concentration initiale de 5-FU, la composition lipidique et la taille des liposomes. La littérature décrit rarement l'encapsulation du 5-FU par d'autres méthodes telles que la méthode d'évaporation en phase inverse où l'EE peut atteindre 34,8% en partant d'une concentration maximale de 5-FU (50 mg/ml) (Fishman *et al.*, 1989). En effet, les méthodes d'encapsulation passive sont envisagées pour encapsuler les PA hydrophiles. Néanmoins, une limitation sérieuse de ces liposomes pour une finalité pharmaceutique concerne l'EE qui tend à être assez faible (Benoît *et al.*, 2007). Des LTST composés d'un ratio initial 5-FU : lipide 12 mM : 12 mM préparés selon la technique d'hydratation du film lipidique présentent une EE de 4% (chapitre 2). Pour ces raisons, nous avons essayé d'optimiser l'EE du 5-FU par la méthode de congélation/décongélation. La méthode de congélation/décongélation (C/D) est classée parmi les techniques qui permettent d'augmenter l'encapsulation des PA (Benoît *et al.*, 2007). Pendant la congélation, les bicouches sont endommagées par la formation de cristaux de glace, elles se rompent ou se fragmentent et les liposomes sont ainsi détruits. Lors de la décongélation, les bicouches endommagées se réassemblent en raison de « l'effet hydrophobe » et les liposomes peuvent fusionner donnant lieu à de nouveaux liposomes d'une taille plus grande. Ainsi, l'EE augmente suite à l'augmentation du rapport PA hydrophile : lipide (Mayer *et al.*, 1985). Cependant, cela est vrai uniquement si l'échantillon est décongelé à une température supérieure à la T_m de la suspension

de liposomes (Hope *et al.*, 1986). Chaque cycle de C/D est l'occasion pour que ce processus se reproduise. Cette technique s'applique aux liposomes de type MLV, LUV et SUV (Bochot *et al.*, 1998; Garg *et al.*, 2009). Elorza *et al.* (Elorza *et al.*, 1993) ont montré que la C/D des liposomes extrudés produit une population monodisperse de liposomes avec un volume interne supérieur à celui des liposomes préparés exclusivement par extrusion à travers des filtres de polycarbonate de taille de pores équivalente. Dans cette partie, nous présentons les résultats d'encapsulation du 5-FU par la technique de C/D.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériels

La DPPC ($T_m = 41,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) a été fournie par Genzyme et le DSPE-PEG₂₀₀₀ par Avanti Polar Lipid. Le CHOL, le 5-FU, le tréhalose et le PBS utilisés proviennent de Sigma. L'eau utilisée a été purifiée à travers un système RIOS/Milli-Q de Millipore.

2.2. Préparation des liposomes par la technique de C/D

En vue d'optimiser l'EE du 5-FU dans les liposomes par la technique de C/D, trois formulations liposomales ont été préparées à la concentration optimale en lipides (chapitre 2 de ce manuscrit). Brièvement, 0,8 mmol de lipides totaux, DPPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ à 0, 5 ou 30 mol% CHOL ont été dissous dans 10 ml de chloroforme dans un ballon de 50 ml. Le solvant a été évaporé sous pression réduite pendant 40 min à 45°C pour former un film lipidique mince. Le film obtenu a été hydraté avec une solution du tampon PBS (10 mM, 138 mM NaCl, pH 7,4) contenant 10% w/v de tréhalose (264,4 mM), à 50°C (température supérieure à la T_m) pendant 30 min. La suspension de MLV obtenue a été soumise à dix cycles d'extrusion sur deux membranes filtres en polycarbonate de taille de pores 100 nm, à 60°C et 508 psi. Un volume de liposomes extrudés contenant 0, 5 ou 30 mol% de CHOL, a été mélangé à volume égal avec une solution concentrée de 5-FU (24 ou 107,6 mM) afin d'obtenir une suspension finale à 40 mM de lipides et 12 ou 53,8 mM de 5-FU, respectivement (expérience réalisée en triplicat). La concentration finale de tréhalose était de 5% w/v (Talsma *et al.*, 1991). Le mélange a été subséquemment soumis à dix cycles de C/D (Bochot *et al.*, 1998) sous agitation légère afin d'homogénéiser la température de l'échantillon. Chaque cycle étant composé de 5 min (Bochot *et al.*, 1998) de congélation dans l'azote liquide à -196°C suivies immédiatement d'une décongélation dans un bain marie maintenu à 60°C (au-dessus de la T_m) pendant une durée égale. Les suspensions de liposomes obtenues ont été soumises aux ultrasons dans un bain à ultrasons à la température ambiante pendant 30 secondes en vue de réduire la perméabilité des

liposomes en accélérant la disparition des défauts de membrane qui surviennent lors de la congélation (Rickwood and Hames, 1989), puis maintenues à température ambiante dans des récipients fermés pendant 1 h (Castile and Taylor, 1999). Les suspensions ont ensuite été conservées à 4°C.

2.3. Détermination de la taille des liposomes

Le diamètre hydrodynamique (d_H) moyen et l'indice de polydispersité (PDI) des liposomes ont été déterminés, avant et après C/D, par la technique de diffusion quasi-élastique de la lumière. Comme décrit dans le chapitre 2, les mesures ont été effectuées à 20°C et la fonction de corrélation de l'intensité a été mesurée à un angle de diffusion de 173°. Préalablement aux mesures, les liposomes ont été dilués dans de l'eau milliQ.

2.4. Détermination de l'EE du 5-FU

Le 5-FU non encapsulé a été éliminé par ultracentrifugation à 150 000 g, 4°C pendant 4 h. Les liposomes du culot ont été solubilisés dans du méthanol. Pratiquement, un volume de liposomes a été mélangé avec 9 volumes de méthanol suivi d'une dilution au dixième dans du PBS. L'EE du 5-FU a été déterminée par CLHP comme décrit dans le chapitre 2.

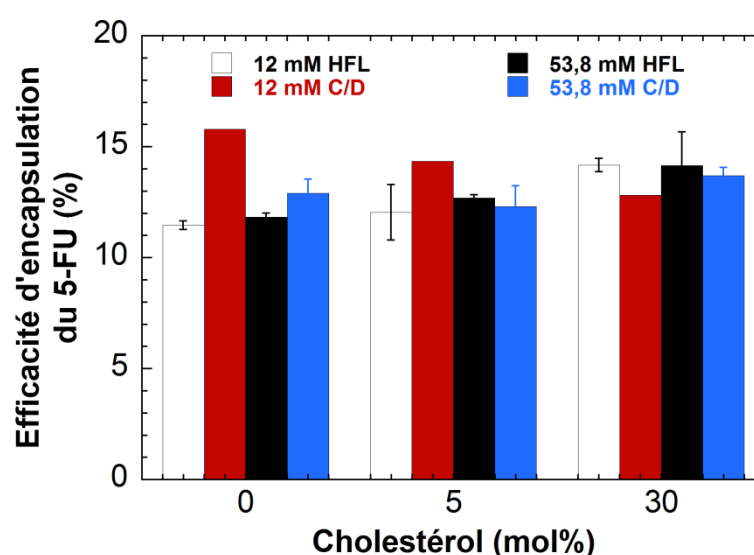
3. Résultats et discussion

La technique de C/D est connue comme étant efficace pour améliorer l'EE des PA hydrophiles (qui n'interagissent pas avec la bicouche) à l'intérieur des liposomes suite à l'augmentation du rapport PA hydrophile : lipide (Mayer *et al.*, 1985). Elle peut être réalisée en présence de tréhalose afin d'éviter l'aggrégation des liposomes et l'augmentation de leur taille (Talsma *et al.*, 1991; Zhao and Lu, 2009), comme en l'absence de tréhalose (Bochot *et al.*, 1998; Garg *et al.*, 2009). Nous avons choisi d'appliquer cette approche en présence de 5% w/v de tréhalose en vue de garder une taille homogène des liposomes autour de 100 nm en moyenne. Le tableau 1 montre que la taille des liposomes ne varie pas après C/D indépendamment de la composition de la bicouche et de la concentration du 5-FU. Par conséquent, la technique de C/D en présence de 5% w/v de tréhalose, permet de garantir une taille constante de liposomes extrudés.

Tableau 1. Effet de la technique de C/D sur la taille des liposomes encapsulant le 5-FU.

Avant C/D			Après C/D		Après C/D	
5-FU : lipides (0 mM : 80 mM)			5-FU : lipides (12 mM : 40 mM)		5-FU : lipides (53,8 mM : 40 mM)	
CHOL (mol%)	d _H (nm)	PDI	d _H (nm)	PDI	d _H (nm)	PDI
0	85	0,09	81 ± 1	0,09 ± 0,01	84 ± 1	0,12 ± 0,01
5	84	0,07	79 ± 3	0,07 ± 0,01	82 ± 1	0,1 ± 0,01
30	150	0,09	139 ± 4	0,07 ± 0,02	143 ± 2	0,08 ± 0,01

L'EE du 5-FU selon la méthode d'encapsulation passive (par hydratation du film lipidique (HFL)) ou la méthode de C/D ont été comparées et représentées sur la figure 1. La technique de C/D n'a pas apporté d'amélioration de l'EE du 5-FU dans les liposomes indépendamment du pourcentage de CHOL au sein de la bicouche. On remarque toutefois, à faible concentration en 5-FU (i.e. 12 mM), une faible augmentation de 4% et de 2% de l'EE du 5-FU dans les liposomes à 0 et 5 mol% CHOL, respectivement. Ceci pourrait être expliqué par le plateau d'encapsulation, atteint aux concentrations initiales 5-FU : lipides 53,8 mM : 40 mM (chapitre 2, figure 1), qui empêche une augmentation additionnelle de la quantité de 5-FU à l'intérieur des liposomes. Tandis qu'aux concentrations initiales 5-FU : lipides 12 mM : 40 mM, le plateau d'encapsulation n'étant toujours pas atteint, une augmentation de l'encapsulation du 5-FU, bien que légère, a été obtenue.

**Figure 1.** Efficacité d'encapsulation du 5-FU à l'intérieur des liposomes (0, 5 ou 30 mol% CHOL) en fonction de la technique d'encapsulation et de la concentration du 5-FU.

4. Conclusion

La technique d'encapsulation par C/D est souvent décrite pour les PA de masse molaire (MM) élevée tels que les oligonucléotides (Bochot *et al.*, 1998), les peptides et les hormones (Talsma *et al.*, 1991; Zhao and Lu, 2009), mais aussi pour les PA de bas poids moléculaire tels que le 5-FU (Garg *et al.*, 2009) et la 5,6 carboxyfluorescéine (Elorza *et al.*, 1993). Dans le cas du 5-FU, l'amélioration de l'EE est légère et limitée surtout aux faibles concentrations. Par conséquent, elle ne constitue pas une technique de base pour l'optimisation de l'EE du 5-FU dans les liposomes. Il est intéressant de noter que plusieurs paramètres influencent l'EE par la technique de C/D y compris la température de décongélation, la durée et le nombre des cycles de C/D et le cryoprotecteur. Une étude de chaque paramètre à part est éventuellement nécessaire afin de mettre au point les conditions optimales convenables à nos formulations. Cette expérience a toutefois permis de mettre en évidence le besoin de développer des approches plus efficaces pour une optimisation de l'encapsulation du 5-FU.

Stabilité au gradient osmotique de l'encapsulation du complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI

1. Introduction

Les bicouches des liposomes miment partiellement les membranes cytoplasmiques. Elles constituent des membranes semi-perméables sélectives à la diffusion de solvants et de solutés en réponse à un gradient de concentration. En effet, les bicouches sont perméables à l'eau, même à l'état « gel » (SO) (Blok *et al.*, 1976), imperméables aux ions (Na^+ , K^+ , Cl^-) et aux solutés polaires (e.g. glucose $\log P_{\text{oct/eau}} = -3,3$) et moins imperméables aux ions H^+ et OH^- (Blok *et al.*, 1976). Par conséquent, lorsque des liposomes, encapsulant de fortes concentrations d'un PA relativement peu perméant, sont suspendus dans un milieu aqueux contenant peu ou pas de soluté, un gradient osmotique est engendré. Ce gradient osmotique favorise l'influx d'eau pour atteindre l'équilibre osmotique. En conséquence, les liposomes gonflent. En revanche, dans des conditions inverses les liposomes se rétractent (Gruner *et al.*, 1985). La sensibilité des liposomes au gradient osmotique est augmentée par la présence du PEG. En effet, le déplacement du plan de glissement à la surface des liposomes par les chaînes de PEG, crée un microenvironnement dépourvu de contre-ions tout autour du liposome, ce qui contribuerait à la création d'un gradient osmotique. Ces observations pourraient expliquer la libération spontanée ou fuite du 5-FU à la dilution des liposomes (1/2,5) dans du PBS (rendu iso-osmotique par rapport à l'intérieur des liposomes par addition de 64 mM de dextrose) avant toute application d'HT (Supplementary figures, chapitre 2). Ainsi, la dilution des liposomes peut être assimilée à une addition de solutés supplémentaires (Na^+Cl^- , K^+ , phosphate, dextrose) qui ne traversent pas la bicouche. Il en résulte une distribution non-équilibrée d'eau et de solutés et un gradient osmotique est engendré à travers la bicouche. Ce gradient osmotique provoque l'efflux d'eau pour atteindre l'équilibre osmotique (Figure 2). En conséquence, les liposomes se rétrécissent, produisant des zones où la bicouche se dilate ou se rétrécit, provoquant des changements locaux de la surface occupée par chaque molécule de phospholipide ainsi qu'une modification significative de la stabilité de la bicouche (Castile and Taylor, 1999). Il peut en résulter une fuite du 5-FU dans le milieu extraliposomal. La fuite du 5-FU est favorisée par son caractère perméant à travers les membranes ($\log P_{\text{oct/eau}} = -0,824$). D'où, la rétention du 5-FU dans la cavité aqueuse des liposomes est difficilement atteinte. Par conséquent, le concept de complexation du 5-FU avec le complexe métallique Cu-PEI nous a semblé pertinent en vue de

favoriser sa rétention à l'intérieur des LTST et LNTS en dépit d'un gradient osmotique généré lors d'une dilution *in vitro* ou suite à une administration par voie IV. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la rétention du 5-FU à l'intérieur des LTST et LNTS, lorsqu'il est complexé au Cu-PEI.

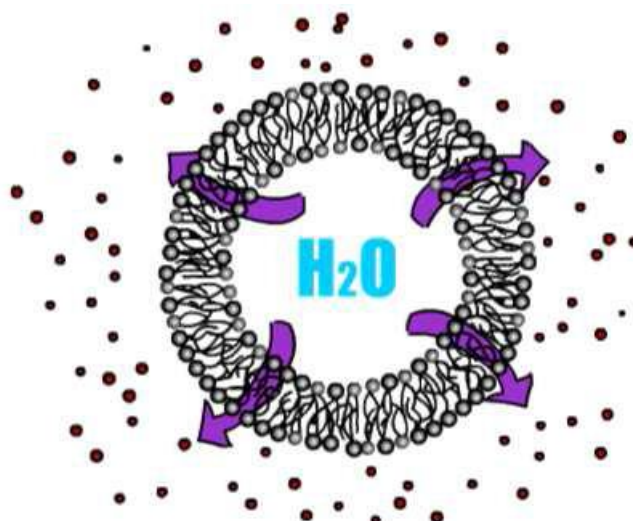


Figure 1. Efflux d'eau à l'extérieur des liposomes précédant le rétrécissement du liposome en réponse au gradient osmotique.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériels

La DPPC ($T_m = 41,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) a été fournie par Genzyme et le DSPE-PEG₂₀₀₀ par Avanti Polar Lipid. Le CHOL, le 5-FU, le dextrose, l'acétate de Cu (II) monohydrate, la PEI₈₀₀ et le PBS utilisés proviennent de Sigma. Le 5-FU radiomarké au ¹⁴C ([2-¹⁴C]-5-FU) a été fourni par Moravek Biochemicals, Inc. Le liquide de scintillation Ultima Gold provient de Perkin Elmer. La poudre Sephadex G-50 pour chromatographie par filtration sur gel a été achetée de chez Pharmacia AB. L'eau utilisée a été purifiée à travers un système RIOS/Milli-Q de Millipore.

2.2. Mesure de l'osmolalité

Une solution d'hydratation Cu-PEI (600 mM-417 mM) dans du PBS 138 mM NaCl a été préparée comme décrit dans le chapitre 2. Afin de vérifier l'effet de la complexation du 5-FU sur l'osmolalité intraliposomale, une solution du complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI a été préparée par dissolution du 5-FU à la concentration 53,8 mM dans la solution d'hydratation. Il s'agit de la concentration totale de 5-FU utilisée lors du processus d'encapsulation. Afin de déterminer

le pourcentage de dextrose requis pour obtenir une solution d'osmolalité équivalente à celle de la solution 5-FU-Cu-PEI, la formule de Lumière et Chevrotier a été appliquée :

$$X (\%) = \frac{\Delta_t - \Delta_1}{\Delta_2}$$

Où X est le poids en (g) de dextrose à rajouter à 100 ml de solution de PBS, Δ_t est l'abaissement du point de congélation de la solution de dextrose/PBS à préparer, Δ_1 est l'abaissement du point de congélation du PBS et Δ_2 est l'abaissement du point de congélation d'une solution à 1% de dextrose (= 0,095°C).

L'abaissement du point de congélation est lié à l'osmolalité par l'équation définie par la pharmacopée :

$$\text{Osmolalité (mosmol/kg)} = \frac{\Delta_t}{1,86} \times 1000$$

L'osmolalité a été mesurée grâce à un micro-osmomètre (Micro-osmometer Automatic Type 13 RS, Hermann Roebling MeBtechnik, Berlin, Germany). Le zéro de l'appareil a été déterminé avec de l'eau et l'osmolalité maximale mesurée a été vérifiée avec un standard commercial de 300 mosmol/kg. L'appareil a été étalonné à l'aide des solutions diluées du complexe ou de dextrose dans du PBS. Du fait de la concentration élevée de toutes les solutions, l'osmolalité a été calculée par extrapolation à partir de la courbe d'étalonnage.

2.3. Préparation des 5-FU-LTST et des 5-FU-LNTS

Les LTST et LNTS chargés en complexe [2-¹⁴C]-5-FU-Cu-PEI ont été préparés par incubation pendant 24 h comme décrit au chapitre 2 section 2.3.3. Ensuite ces liposomes ont été purifiés par chromatographie par filtration sur gel.

2.4. Essais de libération à la dilution

Afin de vérifier la stabilité de l'encapsulation du complexe ternaire au gradient osmotique, une série de dilutions des 5-FU-LTST et les 5-FU-LNTS dans du PBS (138 mM NaCl) ou du PBS (138 mM NaCl + 1776 mM dextrose) a été réalisée. Le 2-¹⁴C-5-FU libéré a été ensuite séparé des liposomes par ultrafiltration sur des filtres centrifugeurs Amicon® Ultra-0,5 (cut-off 100 KDa). Le pourcentage de 5-FU libéré a été mesuré par comptage radioactif.

3. Résultats et discussion

La mesure de l'osmolalité d'une solution aqueuse des complexes binaire et ternaire a donné les valeurs représentées dans le tableau 1. Ces osmolalités sont significativement plus élevées (facteur sept) comparées au PBS iso-osmotique au sang. Néanmoins, la présence du 5-FU à la concentration de 53,8 mM n'augmente pas davantage l'osmolalité. L'encapsulation active du

5-FU sous forme d'un complexe métallique ternaire, 5-FU-Cu-PEI, génère donc une augmentation considérable de l'osmolalité intraliposomale ($MM_{\text{PEI800}} = 800 \text{ g/mol}$, $MM_{5\text{-FU}} = 130,08 \text{ g/mol}$). Par conséquent, la conservation des liposomes en suspension dans un milieu hyper-osmotique est de rigueur afin d'éviter la génération d'un gradient osmotique.

Tableau 1. Osmolalité des solutions du complexe binaire et ternaire, d'égales concentrations, comparée au PBS iso-osmotique.

Solution	Osmolalité (mosmol/kg)
PBS (138 mM NaCl)	279
Cu-PEI/PBS (138 mM NaCl)	1957
5-FU-Cu-PEI/PBS (138 mM NaCl)	1960
Dextrose (1776 mM)/PBS (138 mM NaCl)	2140

Pour cette raison, il était judicieux de calculer la masse de dextrose nécessaire pour ajuster l'osmolalité du PBS à 1960 mosmol/kg. L'application de la formule de Lumière et Chevrotier a donné un pourcentage de dextrose de 32%. Ainsi, les liposomes étaient suspendus continuellement dans une solution de PBS 138 mM NaCl + 1776 mM dextrose.

Les résultats des essais de libération à la dilution sont représentés sur la figure 2. Une diffusion spontanée du complexe ternaire (représenté par le 2-¹⁴C-5-FU dosé) à l'extérieur des LTST et LNTS purifiés de 8% et 20%, respectivement, a été mise en évidence. Bien que la dilution des LTST ne génère pas de fuite supplémentaire indépendamment de l'intensité du gradient osmotique, cependant, les LNTS semblent être plus sensibles en fonction de l'intensité du gradient osmotique.

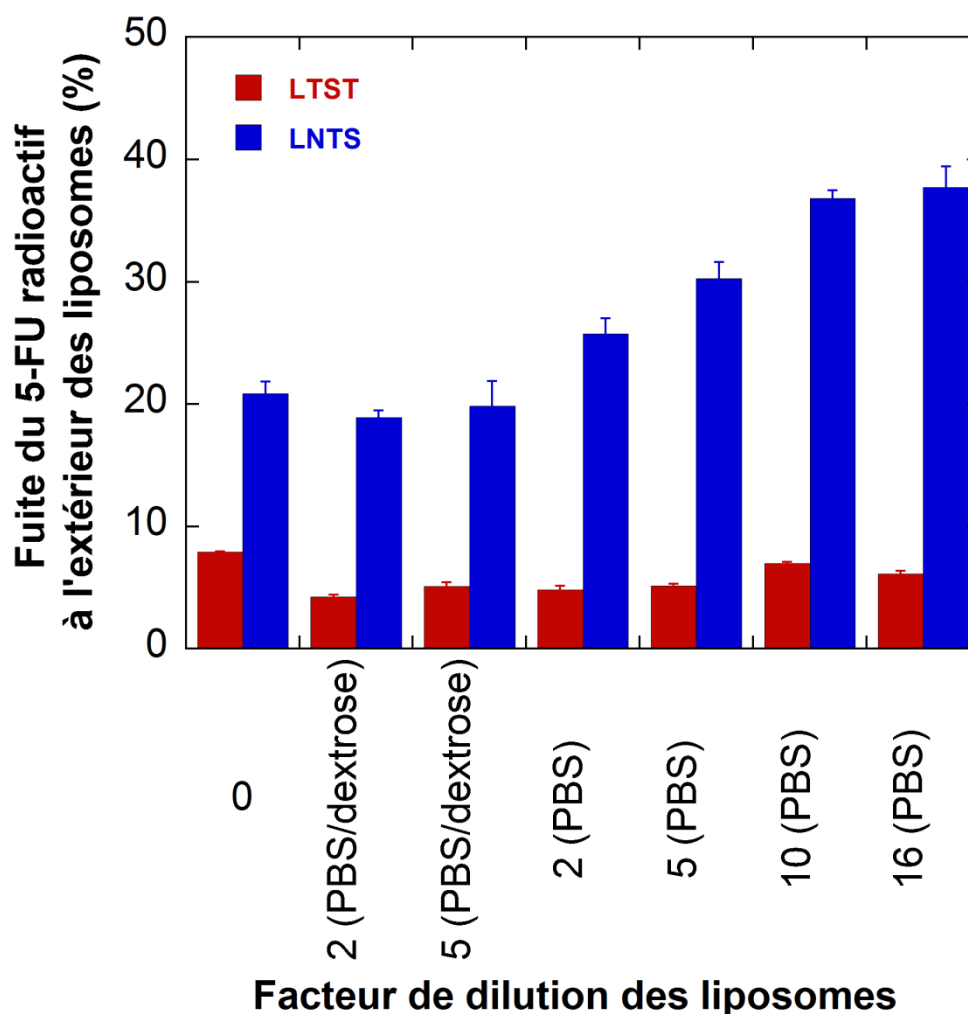


Figure 2. Stabilité des LTST et LNTS chargés du complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI au gradient osmotique, représentée par le pourcentage de fuite du 2-¹⁴C-5-FU.

En effet, les LNTS ne libèrent pas davantage de 5-FU (20%) en dépit d'une dilution au cinquième dans du PBS hyper-osmotique. Néanmoins, le gradient osmotique créé par une dilution au deuxième et au cinquième avec du PBS iso-osmotique déclenche une fuite supplémentaire du complexe de 5% et de 10%, respectivement. Une dilution au dixième entraîne une fuite de 16% supplémentaires, au-delà de laquelle la fuite du complexe ne semble pas augmenter significativement. Ces observations sont concordantes avec les résultats publiés précédemment (Thomas *et al.*, 2011) démontrant que la complexation du 5-FU avec le complexe binaire Cu-PEI réduit et/ou retarde la fuite du 5-FU à l'extérieur des liposomes et que la complexation est réversible. Nos observations démontrent que la dilution des liposomes est un facteur favorable à la libération du 5-FU sous forme complexée ou suite à sa décomplexation. La forme du 5-FU libéré (complexé ou libre) est un aspect intéressant à vérifier. La technique de radioactivité ne permet pas de distinguer le 5-FU complexé du 5-FU libre.

Ces essais ont été réalisés à température ambiante et au pH physiologique et ce pour un temps donné. Les conditions *sink in vivo*, la température physiologique ainsi que l'interaction avec les composants sériques pourraient amplifier la déstabilisation des liposomes sous l'effet du gradient osmotique. Les LTST possèdent toutefois une meilleure stabilité au gradient osmotique comparés aux LNTS. Cela semble contredire plusieurs concepts généraux admettant que l'insertion du CHOL au sein de la bicouche lipidique augmente son organisation et sa rigidité, et que les liposomes (y compris les LTS) de petit diamètre libèrent plus rapidement et plus quantitativement leur charge comparés aux liposomes de plus grande taille (Cui *et al.*, 2007; Hossann *et al.*, 2010). Quant au premier concept, la DPPC est décrite comme formant une bicouche en phase « gel » (SO), et l'insertion du CHOL confère à la bicouche de DPPC un état de phase intermédiaire plus perméable dit liquide ordonné (LO) (Rickwood and Hames, 1989). En plus, il a été démontré que 30 mol% de CHOL réduisent l'énergie d'activation de la perméation d'eau à travers la bicouche à une température inférieure à la T_m (Blok *et al.*, 1977). Ces résultats confirment donc que le CHOL à 30 mol% augmente la perméabilité de la bicouche de DPPC à l'eau.

En se basant sur ces résultats, les tests de libération *in vitro* sous HT (chapitre 2) ont été réalisés en diluant les LTST et les LNTS au seizième dans du PBS hyper-osmotique. La fuite éventuelle du complexe ternaire générée par la dilution a été prise en compte dans le calcul du pourcentage de libération induite par l'HT, étant donné que l'échantillon contrôle (non soumis à une HT) a également été dilué dans les mêmes conditions. La dilution du contrôle au seizième a donné un pourcentage de fuite proche à celui obtenu dans cet essai.

D'autre part, une des exigences associées à une préparation injectable pour la voie IV recommandées par la 7^{ème} édition de la pharmacopée européenne, est l'isotonie au sang. Des solutions hypertoniques peuvent être éventuellement administrées, mais jamais de solutions hypotoniques (risque d'hémolyse). Puisque les LTST et les LNTS sont destinés à la voie IV, et puisque l'osmolalité de la suspension est de 1957 mosm/kg, il était indispensable de réduire l'osmolalité des liposomes avant injection. Tout juste avant l'injection, les liposomes ont été dilués au deuxième dans du PBS iso-osmotique au sang. D'après la figure 3, les suspensions de LTST et LNTS diluées au deuxième libèrent 5% et 25% du complexe, respectivement. Si on considère que le volume total de sang d'une souris de 20 g est d'environ 1,6 ml, l'injection de 150 μ l de liposomes revient à une dilution totale d'environ un facteur 23. Donc on peut s'attendre à la présence de 7% et de 36% de fuite à l'injection à partir des LTST et des LNTS, respectivement. Néanmoins, les résultats de pharmacocinétique (chapitre 3) montrent que les LNTS sont plus stables *in vivo* et circulent pendant plus longtemps dans le sang.

4. Conclusion

En conclusion, l'encapsulation active du 5-FU par complexation intraliposomale avec le complexe Cu-PEI a permis d'optimiser l'EE du 5-FU à 65% par rapport à la méthode d'hydratation du film lipidique (chapitre 2). Les résultats présentés dans le présent chapitre indiquent cette approche pourrait améliorer la rétention du 5-FU à l'intérieur des LTST et LNTS. Toutefois, le déséquilibre osmotique semble être un facteur à l'origine de la fuite du complexe dans le sang comme la pharmacocinétique chez la souris le montre (chapitre 3).

Références

- Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C. (1965a). "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids." Journal of Molecular Biology **13**(1): 238-252.
- Benoît, J. P., Briançon, S., Fattal, E., Fessi, H., Legrand, P. and Passirani, C. (2007). Sphéroïdes et formes vectorisées. Pharmacie Galénique: Formulation et Technologie pharmaceutique. Maloigne. France: 221-250.
- Blok, M. C., Van Deenen, L. L. M. and De Gier, J. (1977). "The effect of cholesterol incorporation on the temperature dependence of water permeation through liposomal membranes prepared from phosphatidylcholines." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **464**(3): 509-518.
- Blok, M. C., Vandeenen, L. L. M. and Degier, J. (1976). "Effect of gel to liquid-crystalline phase-transition on osmotic behavior of phosphatidylcholine liposomes." Biochimica Et Biophysica Acta **433**(1): 1-12.
- Bochot, A., Fattal, E., Gulik, A., Couarraze, G. and Couvreur, P. (1998). "Liposomes dispersed within a thermosensitive gel: A new dosage form for ocular delivery of oligonucleotides." Pharmaceutical Research **15**(9): 1364-1369.
- Castile, J. D. and Taylor, K. M. G. (1999). "Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze-thaw extrusion." International Journal of Pharmaceutics **188**(1): 87-95.
- Cui, J. X., Li, C. L., Guo, W. M., Li, Y. H., Wang, C. X., Zhang, L., Hao, Y. L. and Wang, Y. L. (2007). "Direct comparison of two pegylated liposomal doxorubicin formulations: Is AUC predictive for toxicity and efficacy?" Journal of Controlled Release **118**(2): 204-215.
- Elorza, B., Elorza, M. A., Frutos, G. and Chantres, J. R. (1993). "Characterization of 5-Fluorouracil loaded liposomes prepared by reverse-phase evaporation or freezing-thawing extrusion methods - Study of drug-release " Biochimica Et Biophysica Acta **1153**(2): 135-142.
- Fishman, P., Peyman, G., Hendricks, R. and Hui, S. (1989). "Liposome-encapsulated 3H-5FU in rabbits." International Ophthalmology **13**(5): 361-365.
- Garg, A., Tisdale, A. W., Haidari, E. and Kokkoli, E. (2009). "Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide." International Journal of Pharmaceutics **366**(1-2): 201-210.
- Glavas-Dodov, M., Fredro-Kumbaradzi, E., Goracinova, K., Simonoska, M., Calis, S., Trajkovic-Jolevska, S. and Hincal, A. A. (2005). "The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU." International Journal of Pharmaceutics **291**(1-2): 79-86.
- Gruner, S. M., Lenk, R. P., Janoff, A. S. and Ostro, N. J. (1985). "Novel multilayered lipid vesicles: comparison of physical characteristics of multilamellar liposomes and stable plurilamellar vesicles." Biochemistry **24**(12): 2833-2842.
- Hope, M. J., Bally, M. B., Mayer, L. D., Janoff, A. S. and Cullis, P. R. (1986). "Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid-vesicles." Chemistry and Physics of Lipids **40**(2-4): 89-107.

Hossann, M., Wang, T., Wiggenhorn, M., Schmidt, R., Zengerle, A., Winter, G., Eibl, H., Peller, M., Reiser, M., Issels, R. D. and Lindner, L. H. (2010). "Size of thermosensitive liposomes influences content release." Journal of Controlled Release **147**(3): 436-443.

Mayer, L. D., Hope, M. J., Cullis, P. R. and Janoff, A. S. (1985). "Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles." Biochimica Et Biophysica Acta **817**(1): 193-196.

Rickwood, D. and Hames, D. (1989). Liposomes a practical approach. New York, Oxford University Press.

Talsma, H., Van Steenberg, M. J. and Crommelin, D. J. A. (1991). "The cryopreservation of liposomes: 3. Almost complete retention of a water-soluble marker in small liposomes in a cryoprotectant containing dispersion after a freezing/thawing cycle." International Journal of Pharmaceutics **77**(2-3): 119-126.

Thomas, A. M., Kapanen, A. I., Hare, J. I., Ramsay, E., Edwards, K., Karlsson, G. and Bally, M. B. (2011). "Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-Fluorouracil for parenteral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy." Journal of Controlled Release **150**(2): 212-219.

Zhao, Y. Z. and Lu, C. T. (2009). "Increasing the Entrapment of Protein-Loaded Liposomes with a Modified Freeze-Thaw Technique: A Preliminary Experimental Study." Drug Development and Industrial Pharmacy **35**(2): 165-171.

Discussion générale

Discussion générale

1. Contexte

De nombreux facteurs entravent le succès du traitement du cancer par chimiothérapie. Parmi les problèmes rencontrés, on peut citer un grand volume de distribution des PA qui engendre de faibles concentrations au contact des cellules cancéreuses aux dépens d'une toxicité élevée vis-à-vis des tissus sains. Il en résulte un index thérapeutique étroit. La vectorisation permet de remédier à ces obstacles, essentiellement, en ciblant la tumeur via des nanoparticules permettant d'augmenter la concentration au sein de la tumeur et de diminuer les toxicités non spécifiques du PA. Tous ces facteurs contribuent à améliorer l'index thérapeutique des PA anticancéreux. Cependant, la disponibilité d'un PA pour les cellules tumorales à partir de son vecteur est indispensable en vue d'une activité thérapeutique. Par conséquent, l'activité antitumorale d'un PA encapsulé à l'intérieur des liposomes est le résultat de l'efficacité de ciblage de la tumeur, du pourcentage de libération *in situ* du PA et évidemment des propriétés du modèle tumoral. Actuellement, la délivrance efficace, c'est à dire en quantité suffisante, d'un PA à partir des liposomes demeure le handicap majeur de la nanomédecine appliquée au cancer. La vectorisation de PA dans des LTS constitue une stratégie prometteuse pour un traitement anticancéreux, permettant de surmonter la faible libération du PA à partir des LTS suffisamment rapidement dans le tissu tumoral.

Parmi les deux types de LTS décrits dans la littérature, nous avons choisi de concevoir des LTST. Ces LTST sont capables de retenir le PA et de le concentrer au niveau du tissu de la tumeur, où il sera libéré sous l'effet d'une HT locale induite par des FUS. Plus de cinq décennies après sa découverte, le 5-FU reste l'un des médicaments les plus actifs et demeure une molécule de référence vis-à-vis de nouveaux médicaments. En oncothérapie clinique, le 5-FU est administré par voie systémique IV (les voies intra-artérielle et intrapéritonéale sont décrites dans la littérature sans être toutefois appliquées) en raison d'une dégradation enzymatique rapide et d'une variabilité d'absorption interindividuelle élevée lorsqu'il est administré par voie per os (Alvarez *et al.*, 2012). Des prodrogues du 5-FU ont été synthétisées en vue d'une administration par voie per os afin d'améliorer la qualité de vie des patients tout en réduisant sa dégradation dans le tractus gastro-intestinal et prolongeant en conséquence sa demi-vie. La chimiothérapie orale à base de ces prodrogues a montré une efficacité équivalente au traitement systémique dans certains protocoles, tout en réduisant la dose et la toxicité non spécifique (Miura *et al.*, 2010; Alvarez *et al.*, 2012). Le 5-FU est un anti-métabolite dont l'effet thérapeutique est temps-dépendant. Par conséquent, sa concentration doit être maintenue à un

niveau efficace et pendant une durée suffisante au niveau de la tumeur. L'inconvénient de ces prodrogues est qu'elles requièrent une ou plusieurs biotransformations enzymatiques ainsi qu'une observance rigoureuse de la part du patient. Bien que la PEGylation des prodrogues du 5-FU puisse répondre au premier besoin, le ciblage passif de la tumeur constitue cependant une propriété des nanoparticules.

À l'heure actuelle, il existe un grand intérêt pour le développement de nouveaux traitements innovants pour l'administration du 5-FU et de ses dérivés en vue d'une part, de prolonger la demi-vie plasmatique du 5-FU, et d'autre part, d'assurer son accumulation préférentielle dans la tumeur et atténuer ses effets indésirables. Grâce à leur taille nanométrique et à la présence du PEG à leur surface, les liposomes PEGylés circulent longtemps dans le sang et bénéficient par la suite de l'effet EPR pour s'accumuler sélectivement dans la tumeur. D'où le rationnel d'une forme vectorisée du 5-FU.

Afin d'établir une formulation de LTST contenant le 5-FU, le cahier des charges était le suivant:

- EE suffisante pour exercer une activité thérapeutique.
- Rétention intraliposomale *in vitro* et *in vivo* à 37°C satisfaisante.
- Capture limitée par le SPM (opsonisation et phagocytose macrophagique).
- Ciblage passif de la tumeur (accessibilité du tissu tumoral).
- Libération efficace déclenchée par HT du 5-FU encapsulé.
- Efficacité antitumorale.

Ce projet multidisciplinaire a permis de réaliser le design, la formulation, l'encapsulation du 5-FU ainsi que l'optimisation de deux formulations de LTST et LNTS et l'évaluation de leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leurs propriétés toxicologiques *in vitro*. Egalement, la pharmacocinétique et la biodistribution *in vivo* des LTST et LNTS optimisés ont été réalisées. En partant des concentrations optimales en lipides (40 mM) et 5-FU (53,8 mM) (chapitre 2), la technique d'encapsulation active du 5-FU par complexation intraliposomale a donné des résultats satisfaisants. En effet, l'EE de 37% obtenue correspond à une encapsulation de 2,7 mg de 5-FU/ml de liposomes. La littérature rapporte une dose thérapeutique *in vivo* de 20 mg de 5-FU/kg de souris (Thomas *et al.*, 2011). Par conséquent, la concentration encapsulée répond aux exigences d'une application thérapeutique *in vivo*. En revanche, la rétention du 5-FU *in vivo* à 37°C et sa libération dans la tumeur sous HT induite par des FUS constitue un défi important. L'étude pharmacocinétique des 5-FU-LTST et des 5-FU-LNTS chez la souris porteuse d'un modèle de tumeur colorectale xénotransplantée (chapitre 3) a révélé une sortie prématurée du 5-FU dans le sang. Cette fuite est plus importante dans le cas des 5-FU-LTST que les 5-FU-LNTS.

Cela a eu pour conséquence d'entraîner une concentration tumorale des liposomes plus faible que l'accumulation attendue.

Dans cette discussion nous nous intéresserons en particulier :

- A la formulation de LTST et de LNTS et à son impact sur la thermosensibilité.
- A l'EE et la rétention du 5-FU à l'intérieur des LTST et des LNTS.
- A la libération du 5-FU déclenchée par les FUS.
- Au devenir des 5-FU-LTST et des 5-FU-LNTS *in vivo*.
- A l'efficacité antitumorale des 5-FU-LTST combinés aux FUS chez la souris.

2. Formulation de liposomes thermosensibles traditionnels et de liposomes non thermosensibles et son impact sur la thermosensibilité

Afin de concevoir des LTST, nous avons opté pour un mélange de trois composants lipidiques : DPPC, CHOL et DSPE-PEG₂₀₀₀. La DPPC représente le lipide thermosensible qui se caractérise par une T_m de $41,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (Needham and Dewhirst, 2001), permettant de viser une libération du 5-FU dans la gamme des températures modérées ($39-42^\circ\text{C}$). Le choix du CHOL a été basé sur la stabilité *in vivo* qu'il confère à la bicouche composée de phospholipides saturés. En augmentant l'ordre d'empilement au sein de la bicouche, le CHOL augmente ainsi la résistance de cette dernière à la déstabilisation par les composants sanguins, et inhibe l'adsorption des opsonines sériques sur les liposomes. Il en résulte une augmentation de la demi-vie plasmatique des liposomes (Semple *et al.*, 1996). Le DSPE-PEG₂₀₀₀ à 5 mol% permet la formulation de LTST furtifs capables de contourner le SPM grâce à la stabilisation stérique de la surface des liposomes (Li *et al.*, 2010). L'inhibition de l'élimination des liposomes par les phagocytes du SPM permet la prolongation de leur temps de circulation dans le sang et le bénéfice par la suite de l'effet EPR pour s'accumuler sélectivement dans la tumeur.

Cependant, l'inclusion du CHOL est décrite pour compromettre la propriété de thermosensibilité de la bicouche de DPPC. En effet, le CHOL réduit l'enthalpie de transition de phase de la DPPC d'une façon concentration-dépendante, et l'abolit complètement à des concentrations au-delà de 30 mol% (Semple *et al.*, 1996). Nous avons mis à profit cette propriété du CHOL en vue de formuler des LTST et leur contrôle négatif les LNTS, en variant les proportions molaires des trois lipides. En conséquence, nous avons conçu des LTST composés de DPPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (90 : 5 : 5 mol%), et des LNTS composés de DPPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (65 : 30 : 5 mol%). L'étude des LTST et LNTS blancs par la technique de calorimétrie différentielle à balayage (en anglais differential scanning calorimetry ou DSC) a révélé une thermosensibilité des LTST à 41°C avec une enthalpie de transition de

phase ΔH de 18,6 J/g de DPPC, tandis que les LNTS n'ont montré aucune thermosensibilité sur une plage de température entre 20 et 80°C (ΔH de 0 J/g de DPPC) (chapitre 1).

L'encapsulation du fluorophore calcéïne comme un modèle de molécule hydrophile a permis de réaliser des essais de libération température-dépendante. Le dosage spectrofluorimétrique de la quantité de calcéïne libérée a indiqué un relargage inférieur à 4% au bout de 5 min à 37°C à partir des LTST. Aucune libération n'a été détectée à partir des LNTS à 37°C. Ces résultats indiquent que les deux formulations sont suffisamment stables à 37°C ce qui constitue un pré-requis pour une application thérapeutique. Néanmoins, ces essais ont été effectués dans un tampon PBS qui ne mime pas complètement le milieu physiologique. Le sang est un milieu complexe qui contient des cellules (endothéliales et sanguines) et des protéines et lipoprotéines diverses (albumine, globulines, HDL...). La présence continue de conditions « sink » dans le sang ainsi que l'interaction de divers composants sanguins avec la bicouche lipidique provoquent la désorption progressive de ses constituants (DSPE-PEG₂₀₀₀, MSPC), ce qui entraîne un affinement de la bicouche à l'origine d'une sortie prématurée du PA encapsulé. A savoir, le HDL est connu pour déstabiliser les liposomes en catalysant l'échange de phosphatidylcholine à partir de liposomes vers des particules de HDL et que l'addition de CHOL augmente la stabilité des liposomes en inhibant cet échange (Allen, 1981). La présence du CHOL au niveau de la bicouche nous a donc paru efficace pour renforcer la résistance des liposomes à la déstabilisation dans le sang. Les résultats de relargage de la calcéïne à 42°C ont montré une sortie de 38% au bout de 5 min, alors que les LNTS, quant à eux, libèrent seulement 0,45%. Ces résultats indiquent que les LNTS sont stables à 42°C conformément aux résultats de la DSC et confirment que la composition des LNTS est adaptée à un modèle de LNTS. Il est cependant intéressant de noter, que la libération de calcéïne à 42°C à partir des LTST n'est pas totale. Un maximum de libération de 53% a été atteint avec les liposomes formés de 10 mol% de CHOL. La libération incomplète à partir des LTST DPPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (90 : 5 : 5 mol%) pourrait être due à la DPPC elle-même dont les vésicules sont décrites pour libérer leur contenu lentement et de manière incomplète (Gaber *et al.*, 1995). Afin d'améliorer les propriétés de libération de ces liposomes, certains auteurs ajoutent d'autres phospholipides tels que la phosphatidylcholine hydrogénée de soja (HSPC) ou son composant majeur la DSPC (Yatvin *et al.*, 1978; Gaber *et al.*, 1995). La DSPC est un phospholipide à deux chaînes hydrocarbonées saturées à 18 carbones (18 : 0, 18 : 0) ayant une T_m de 54,5°C (Semple *et al.*, 1996). La présence simultanée de DPPC et de DSPC au sein de la bicouche crée une incompatibilité d'empilement qui augmente la perméabilité de la bicouche à la T_m . En effet, suite au procédé d'hydratation du film lipidique et lors du refroidissement à une température

inférieure à la T_m , la bicouche ne se solidifie pas de façon uniforme donnant lieu à des domaines solides à l'intérieur de la membrane liquide. Ces domaines s'orientent en treillis et se rencontrent à différentes orientations. Lors d'une HT à la T_m , l'isomérisation trans-gauche commence et les premiers domaines solide/liquide sont formés au niveau des frontières solides/liquides préexistantes. La présence de ces frontières accélère donc la formation de domaines solides/liquides et améliore la perméabilité de la bicouche au cours de la transition de phase (Ta and Porter, 2013). D'autre part, à l'état « gel », l'addition de la DSPC rend la bicouche de DPPC plus rigide, moins perméable et plus résistante à la déstabilisation par les opsonines sériques. De plus, il a été rapporté que la libération *in vivo* de PA à partir des LTS se produit principalement à un ou deux degrés en dessous de la transition de phase en raison de la présence des joints des domaines solide/liquide au sein du plan de la membrane (Needham and Dewhirst, 2001). Par conséquent, la DSPC est ajoutée dans le but de réduire la libération de PA à 37°C tout en augmentant la T_m de la bicouche. Les formulations qui sont décrites dans la littérature comprennent un mélange de HSPC/DPPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ et présentent une T_m dans la gamme de 43 à 45°C (Gaber *et al.*, 1995; Al-Jamal *et al.*, 2012). Gaber *et al.* (Gaber *et al.*, 1995) ont montré que l'obtention de liposomes stables à 37°C qui libèrent leur contenu entre 42 et 45°C, requiert une composition lipidique ayant une T_m autour de 45°C. Néanmoins, cette plage de température dépasse la gamme d'HT modérée cliniquement atteignable (39-42°C), et peut entraîner une nécrose des tissus sains entourant la tumeur. Donc, la DSPC élargit et augmente la T_m de la bicouche à laquelle s'ajoutent les impacts négatifs du DSPE-PEG et du CHOL sur la thermosensibilité des liposomes. Au final, malgré l'insertion de la DSPC, la libération de PA était toujours relativement faible (~ 50% après 30 minutes de chauffage à 42°C) (Gaber *et al.*, 1995).

Au vu des résultats de la DSC, des essais de libération de la calcéine température-dépendante, et des résultats de la littérature, les deux formulations nous ont semblé pertinentes pour envisager une encapsulation du 5-FU, des essais de libération FUS-dépendante ainsi qu'une administration *in vivo*.

3. Efficacité d'encapsulation et rétention du 5-FU à l'intérieur des liposomes thermosensibles traditionnels et de liposomes non thermosensibles

Le 5-FU est un PA anticancéreux de faible MM (130,08 g/mol), hydrophile et capable de traverser les bicouches lipidiques ($\log P_{\text{oct/eau}} = -0,824$). Les tentatives d'encapsulation du 5-FU

dans des liposomes ont, jusqu'à présent, échoué à aboutir à un vecteur stable capable de retenir efficacement le 5-FU (Ozer and Talsma, 1989; Elorza *et al.*, 1993; Fresta *et al.*, 1993). A partir d'un ratio initial 5-FU : lipide de 12 mM : 12 mM, l'encapsulation passive du 5-FU par la méthode d'hydratation du film lipidique à l'intérieur des LTST et des LNTS a abouti à une EE de 4 et 5%, respectivement. Les LTST et les LNTS voient leur EE s'accroître à 13% (taux de charge 19%) et 14% (taux de charge 22%), respectivement, suite à l'augmentation du ratio initial 5-FU : lipide à 53,8 mM : 40 mM. Au-delà de ce ratio, les taux de charge n'évoluent plus en dépit d'une augmentation supplémentaire de l'EE (jusqu'à 28%) (chapitre 2). Ces résultats sont concordants avec les valeurs trouvées dans la littérature. A savoir, Ozer et Talsma ont obtenu un taux de charge de 6% à l'intérieur de liposomes de type LUV à l'état « gel » (Ozer and Talsma, 1989), alors que Glavas-Dodov *et al.* rapportent une EE ne dépassant pas les 25% à l'intérieur des liposomes de type MLV (Glavas-Dodov *et al.*, 2005). Les propriétés physico-chimiques (faible MM, forte diffusion à travers la bicouche) du 5-FU font que ce dernier est faiblement retenu dans la cavité aqueuse des liposomes produisant une faible encapsulation. On note que l'EE de 25% à l'intérieur des MLV obtenue par Glavas-Dodov *et al.* (Glavas-Dodov *et al.*, 2005) s'explique par la grande taille de ces derniers (5 μ m) et leur multilamellarité. Etant donné que le 5-FU ne s'associe pas à la bicouche lipidique, le volume aqueux encapsulé est d'une importance majeure afin d'atteindre une EE élevée. De plus, les MLV ont montré à la fois une bonne EE et une bonne stabilité d'encapsulation du 5-FU par rapport aux LUV en raison de la présence de plus d'une bicouche lipidique à traverser avant la sortie du 5-FU (Fresta *et al.*, 1993). Les MLV ne sont toutefois pas convenables pour une administration par voie IV en raison de leur taille, et leur multilamellarité ne convient pas à une libération déclenchée par HT. Par ailleurs, l'encapsulation active du 5-FU par la méthode de congélation/décongélation à l'intérieur de LTST et de LNTS préformés (5-FU : lipide 53,8 mM : 40 mM) ne nous a pas permis d'améliorer l'EE du 5-FU au sein des liposomes.

C'est pour cette raison que nous nous sommes tournés vers une technique d'encapsulation active. En considérant le ratio initial 5-FU : lipide 53,8 mM : 40 mM, cette technique d'encapsulation active par complexation du 5-FU au sein de la cavité liposomale a permis d'obtenir une EE de 37% (taux de charge 52%) et 38% (taux de charge 56%) dans les 5-FU-LTST et les 5-FU-LNTS, respectivement. Comparativement à l'encapsulation passive et l'encapsulation par congélation/décongélation du 5-FU, l'encapsulation du complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI améliore l'EE ainsi que le taux de charge d'un facteur trois environ. La complexation du 5-FU augmente sa rétention par une réduction de la capacité du 5-FU retenu au sein du complexe à diffuser à travers la membrane liposomale. Thomas *et al.* rapportent une

EE du complexe 5-FU-Cu-PEI supérieure à 95% à l'intérieur des liposomes composés d'un mélange DSPC/CHOL (55 : 45 mol%) (Thomas *et al.*, 2011). Ce résultat montre donc qu'il est possible d'améliorer davantage l'EE du complexe ternaire en fonction de la composition de la bicouche et d'autres facteurs. Des résultats similaires ont été obtenus par Kheirrolomoom *et al.* (Kheirrolomoom *et al.*, 2013) où la doxorubicine a été encapsulée à 100% sous forme d'un complexe Cu-doxorubicine en présence de triéthanolamine en comparaison avec l'encapsulation de la doxorubicine libre (EE de 50%). Parmi ces facteurs, le ratio PEI/Cu pourrait influencer le pourcentage de complexation du 5-FU au Cu et par la suite son EE. Le Cu a une coordinence égale à quatre et le ratio idéal nombre de moles d'azote/ nombre de moles de Cu est compris entre 4/1 (von Zelewsky *et al.*, 1993) et 5/1 (Perrine and Landis, 1967). Par conséquent, idéalement, chaque atome de Cu devrait pouvoir se lier à quatre atomes d'azote. Dans nos conditions de travail, le calcul du ratio azote/ Cu donne 9,7/1. Ce qui correspond à 1 atome de Cu pour environ 10 atomes d'azote. L'acétate de Cu à la concentration de 600 mM semble donc être en défaut. Par conséquent, une augmentation de la concentration de Cu pourrait être judicieuse en vue d'optimiser le complexe 5-FU-Cu-PEI formé. Plus il y a de Cu complexé à la PEI, plus le 5-FU se lie au complexe. Il faudrait toutefois optimiser les concentrations des trois composants du complexe afin que le Cu soit disponible pour complexer le 5-FU.

En outre, l'impact du pH est important. En effet, la PEI est une base polyaminée dont le degré de protonation et la conformation moléculaire sont fortement dépendants du pH de la solution aqueuse. Par conséquent, la formation des complexes métalliques de coordination entre la PEI et le cation métallique est aussi pH-dépendante (von Zelewsky *et al.*, 1993). La figure 1 représente le degré de protonation α de la PEI ainsi que sa conformation moléculaire en fonction du pH.

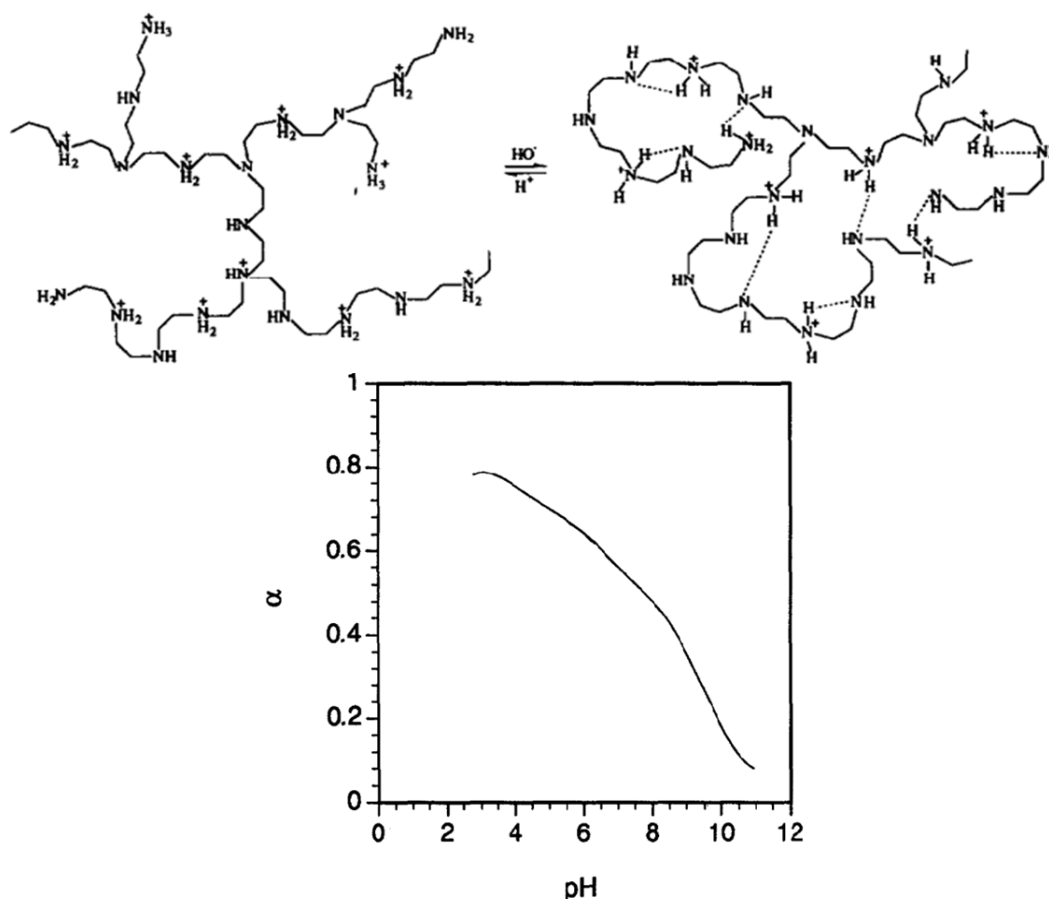


Figure 1. Représentation graphique de la conformation moléculaire (haut) et du degré de protonation α de la PEI en fonction du pH (bas). Adaptée de Zelewsky *et al.* 1993 (von Zelewsky *et al.*, 1993).

A un pH inférieur à 2, la PEI est entièrement protonée ($(\text{HPEI})^+$), les fonctions amines ne sont donc pas disponibles pour complexer le Cu, aucun complexe métallique n'est formé. La PEI protonée et les complexes $\text{H}_2\text{O}-\text{Cu}$ coexistent en solution. Dans ces conditions, la PEI présente une conformation étendue en raison des répulsions électrostatiques qui existent entre les fonctions amines chargées. A une valeur de pH comprise entre 2 et 5, un complexe métallique $\text{Cu}(\text{PEI})_4^{2+}$ est formé. A pH 5,5, 70% des amines sont protonées (Borkovec and Koper, 1997). Entre pH 5 et 7, un complexe de type $\text{Cu}(\text{PEI})_5^{2+}$ est formé, alors qu'au-delà de pH 7, la PEI est de moins en moins protonée, des complexes de type hydroxo $\text{Cu}(\text{OH})_2$ sont formés ce qui provoque une compétition entre les ions hydroxy et les groupes amines à former des complexes avec le Cu. Dans ces conditions, la PEI présente une conformation de plus en plus compacte en raison de l'interaction croissante qui existe entre les fonctions amines chargées et les fonctions amines non chargées via des liaisons de type hydrogène. Au-delà d'un pH de 11, la PEI est non protonée. Par conséquent, la gamme de pH intermédiaire, $4 < \text{pH} < 9$, est la plus appropriée pour la formation de complexes métalliques. Au cours de la formation du

complexe, une diminution du pH est observée en raison de la liaison des ions métalliques avec une libération simultanée de protons selon l'équation : $n(\text{HPEI})^+ + \text{M}^{x+} \rightarrow [\text{M}(\text{PEI})_n]^{x+} + n\text{H}^+$. Pour préparer la solution du complexe Cu-PEI nous sommes partis d'un tampon PBS de pH 7,4. A la fin de la réaction de complexation, la mesure du pH de la solution produit une valeur de 10,9. Cette augmentation de pH (au lieu de la diminution de pH par libération de H^+) n'exclut pas la formation du complexe qui a été mise en évidence par spectrophotométrie, mais, elle reflète toutefois le caractère basique de l'acétate de Cu en solution. L'alcalinisation du milieu peut, cependant, réduire la coordination du Cu ce qui entraînera moins de site de complexation du 5-FU par la suite.

Une autre approche pourrait consister à hydrater le film lipidique avec une solution du complexe ternaire et à comparer l'EE résultante avec celle de l'encapsulation active. Cette approche est simple mais nous ne l'avons pas testée pour des raisons d'incapacité à utiliser l'extrudeur avec des produits radioactifs.

La rétention du PA à l'intérieur des liposomes reflète leur stabilité et constitue une propriété primordiale d'un vecteur utilisé dans un but de ciblage. Jusqu'à présent, l'encapsulation du 5-FU dans des nanoparticules polymériques ou des liposomes sans complexation n'a pas réussi à améliorer son activité thérapeutique par rapport à une dose optimale de 5-FU non encapsulé. Cet échec est attribué à la libération significative rapide du 5-FU à l'extérieur de son vecteur par effet « burst » (Bozkir and Saka, 2005) ou par une diffusion accrue à travers la bicouche lipidique (Ozer and Talsma, 1989; Fresta *et al.*, 1993; Kaiser *et al.*, 2003). L'encapsulation du complexe ternaire de 5-FU nous a semblé l'unique stratégie qui permet d'améliorer sa rétention (chapitre 2). Nos résultats viennent corroborer ceux de Thomas *et al.* qui ont été produits au moment où nous démarrions notre étude. En effet, suite à une dilution au dixième des LTST et des LNTS encapsulant le 5-FU (non complexé), 12% seulement de 5-FU sont retenus. En revanche, les 5-FU-LTST et les 5-FU-LNTS (encapsulant le complexe 5-FU-Cu-PEI) retiennent jusqu'à 93% et 63% de 5-FU, respectivement (Figure 2).

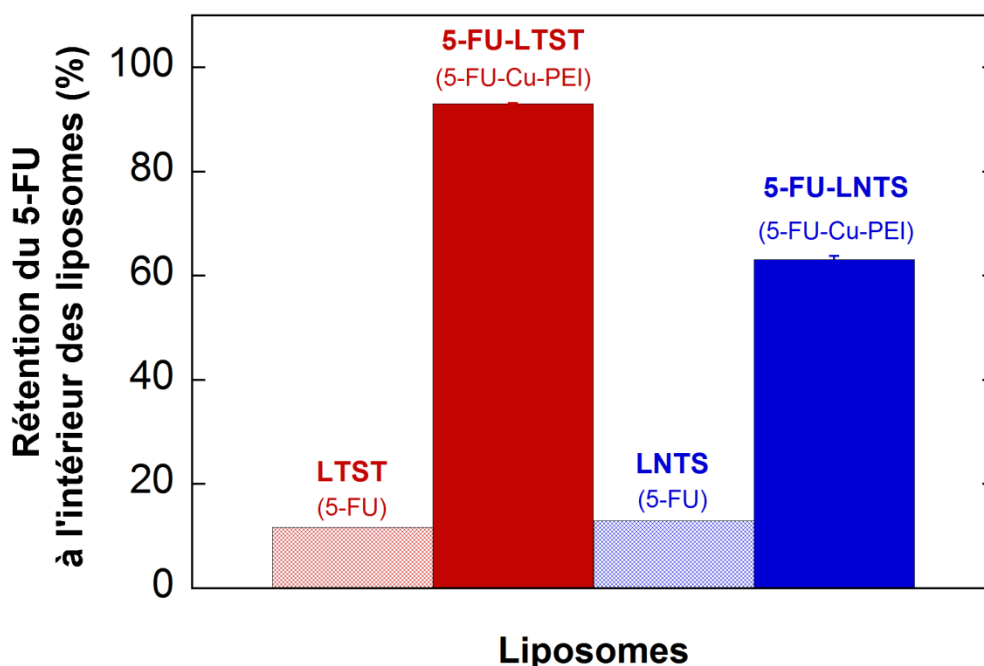


Figure 2. Amélioration de la rétention du 5-FU à l'intérieur des LTST et des LNTS, sous l'effet d'une dilution au dixième, par encapsulation active sous forme de complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI.

La complexation du 5-FU avec le complexe binaire Cu-PEI favorise donc sa rétention qui n'est toutefois pas suffisamment stable, particulièrement dans le cas des 5-FU-LNTS, pour vaincre l'effet de la dilution. Comparativement aux 5-FU-LTST, la faible stabilité *in vitro* des 5-FU-LNTS proviendrait de la présence du CHOL à 30 mol% ce qui accroîtrait la perméabilité de la bicouche comme cela a été décrit dans les parties travaux antérieurs et travaux de recherche non soumis à publication. En outre, les mesures du potentiel zêta des LNTS encapsulant le complexe binaire Cu-PEI indiquent une charge négative ($-2,9 \pm 5,2$ mV) légèrement plus faible par rapport aux LTST ($-6,6 \pm 4,5$ mV). Il en découle une deuxième hypothèse à cette différence de stabilité qui consiste en une adsorption du complexe Cu-PEI à la surface des LNTS lors de l'étape d'hydratation. La présence du complexe Cu-PEI chargé positivement à la surface des LNTS entraîne une diminution de la charge de surface vers des valeurs plus proches de la neutralité. Cette adsorption pourrait être favorisée par la présence du CHOL à 30 mol%, et elle pourrait entraîner une complexation extraliposomale du 5-FU. Cette dernière serait à l'origine d'une libération « burst » du 5-FU. Ces observations concernant l'instabilité de la complexation du 5-FU sont concordantes avec les résultats publiés précédemment (Thomas *et al.*, 2011) démontrant que la formation du complexe 5-FU-Cu-PEI est réversible, que le 5-FU se dissocie du complexe ternaire au cours du temps et traverse une membrane de dialyse sous forme libre. L'avantage principal de cette stratégie réside donc dans

le fait de retarder la fuite du 5-FU à l'extérieur des liposomes. Dans nos conditions de dilution, il aurait été intéressant de vérifier par spectrophotométrie ou par chromatographie liquide haute performance la forme sous laquelle le 5-FU est libéré (complexé ou décomplexé). De même à la suite des essais de libération température-dépendante, il aurait été judicieux de confirmer l'hypothèse que le 5-FU est libéré sous forme complexée ou éventuellement sous forme d'un mélange de 5-FU libre et complexé. On note que la stabilité des complexes de coordination peut être pH-dépendante. Kheirloomoom *et al.* (Kheirloomoom *et al.*, 2013), ont démontré que le complexe Cu-doxorubicine encapsulé à l'intérieur des LTSL par la méthode de gradient de pH est libéré dans le sang sous forme complexée, et que la doxorubicine n'est dissociée du complexe qu'à pH acide. La stabilité du complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI en fonction du pH devrait faire l'objet d'une étude du même type.

Les résultats de la rétention du 5-FU dans les liposomes nous amènent à deux constatations : Premièrement, la sortie prématurée du 5-FU dans le sang à partir des 5-FU-LTST et à moindre degré des 5-FU-LNTS en post-injection chez la souris est attribuée à l'instabilité du complexe ternaire dans les conditions « sink ». La température physiologique ainsi que l'interaction avec les composants sériques seraient capables d'amplifier la déstabilisation des liposomes et ainsi le pourcentage de sortie prématurée du 5-FU dans le sang. Thomas *et al.* (Thomas *et al.*, 2011) ont également remarqué une fuite du 5-FU à 37°C. Les 5-FU-LTST sont les plus stables *in vitro* alors qu'ils sont les moins stables *in vivo*. Cette opposition des résultats de stabilité *in vivo* et *in vitro* vient confirmer l'effet stabilisant *in vivo* du CHOL au niveau des 5-FU-LNTS.

Deuxièmement, la nécessité d'optimiser l'encapsulation active du 5-FU par complexation s'avère indispensable. L'optimisation peut porter sur la composition de la bicouche et/ou la technique de complexation. L'incorporation de DSPC augmente la rigidité de la bicouche, la rend moins perméable et plus résistante à la déstabilisation par les composants sériques, ce qui permet finalement aux liposomes de circuler plus longtemps tout en réduisant la sortie prématurée dans le sang. La formulation du Caelyx® (forme liposomale de doxorubicine) dont la bicouche rigide est composée de HSPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ (55 : 40 : 5 mol%) (Charrois and Allen, 2004) a montré une excellente stabilité *in vivo*. En effet, les études ont mis en évidence une élimination du Caelyx® sous forme intacte dans le sang (Gabizon *et al.*, 1994) grâce à sa composition lipidique. Au vu de ces résultats, il serait judicieux de reprendre cette composition, d'y ajouter la DPPC tout en variant le pourcentage de HSPC afin de conférer à la bicouche une thermosensibilité aux températures modérées (39-42°C).

D'autre part, malgré la propriété de furtivité apportée par le DSPE-PEG, toutes les études ont montré qu'il favorise la fuite de PA dans le sang (Gaber *et al.*, 1995). Récemment Lindner

et al. (Lindner *et al.*, 2004) ont décrit un substitut au DSPE-PEG, le 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoglycéroglycérol (DPPGOG) ($T_m = 39,7^\circ\text{C}$) (Figure 3) qui fournit aux LTS une meilleure stabilité au contact du sérum à 37°C en comparaison avec les LTSL (libération de 6,4% de carboxyfluorescéine en 60 min), une circulation prolongée (temps de demi-vie plasmatique de $9,6 \pm 1,3$ h chez la souris) ainsi qu'une libération rapide et efficace en présence d'une HT modérée (libération de plus de 80% de carboxyfluorescéine en 3 min à 42°C).

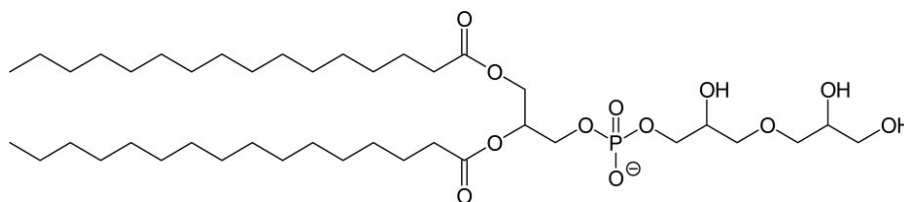


Figure 3. Structure chimique du DPPGOG. Adaptée de Lindner *et al.* 2004 (Lindner *et al.*, 2004).

Ce qui rend cette molécule exceptionnellement intéressante c'est que malgré la présence du DPPGOG chargé négativement à 30 mol% dans les LTS, ces derniers ont montré un bon évitement de la capture macrophagique. En effet, les liposomes contenant des lipides chargés négativement tels que la phosphatidylsérine, le phosphatidylglycérol, sont généralement éliminés rapidement de la circulation sanguine suite à des interactions spécifiques avec les protéines plasmatiques entraînant leur capture par le SPM (Allen *et al.*, 2002). En outre, il est décrit que les liposomes portant une charge de surface négative sont de forts activateurs du système du complément (Moghimi *et al.*, 2010), il serait donc intéressant d'étudier le comportement des liposomes composés de DPPGOG vis-à-vis du complément.

De plus, il est pertinent de noter qu'une composition identique à celle des LTSL comportant 10 mol% du lysolipide MSPC ou MPPC diminue et élargit la T_m de la DPPC, et subit, de plus, une désorption du lysolipide (70% en 1 h après injection *in vivo* (Banno *et al.*, 2010)) qui engendre des défauts membranaires à l'origine d'une fuite prématurée du PA dans le sang à température physiologique (10-20% de doxorubicine libérée en 30 min au contact avec 50% du plasma fœtal *in vitro*) (Banno *et al.*, 2010; Tagami *et al.*, 2011; Ta and Porter, 2013). Le résultat sera, par conséquent, un retour à un comportement de PA libre et aux effets toxiques systémiques associés. Le concept des LTSL n'est donc pas adapté à un PA dont la stabilité d'encapsulation est faible. Le mélange des quatre composants lipidiques DPPC/MSPC/CHOL/DSPE-PEG₂₀₀₀ n'est toutefois pas encore étudié en termes de stabilité à 37°C *in vivo*.

Quant à la technique d'encapsulation, la complexation du 5-FU, telle qu'elle est effectuée dans le présent travail, est insatisfaisante pour une rétention optimale du 5-FU *in vivo* à 37°C (chapitre 3). Ce résultat pourrait être dû à de nombreux facteurs tels que le type de ligand et/ou de métal, les conditions chimiques d'encapsulation et/ou la technique elle-même. Il serait donc pertinent d'optimiser davantage cette technique de manière à renforcer la stabilité du complexe afin de réduire la dissociation du 5-FU et/ou empêcher la sortie prématurée du 5-FU.

Le choix d'une PEI ramifiée et du Cu semble le plus pertinent puisque les PEI ramifiées sont connues pour former de complexes métalliques de coordination plus stables que ceux formés avec les PEI linéaires. De plus, c'est avec le Cu que la PEI forme les complexes les plus stables (von Zelewsky *et al.*, 1993). L'étude d'autres polymères hydrophiles tels que le chitosan qui forme des complexes de coordination avec le Cu semble toutefois une piste intéressante à étudier.

Le 5-FU est une molécule neutre qui peut être facilement déprotonée en position 1-N ou 3-N. En milieu intraliposomal alcalin, le 5-FU peut se déprotoner (5-FU^-) et former ainsi des complexes polyélectrolytiques avec la PEI protonée (HPEI^+) ou avec le complexe chargé positivement $\text{Cu}(\text{PEI})_4^{2+}$ ou $\text{Cu}(\text{PEI})_5^{2+}$. Les complexes électrostatiques sont en fait moins puissants que les complexes de coordination, et cela pourrait être à l'origine d'une dissociation rapide du 5-FU à la dilution entraînant sa libération. Un milieu intraliposomal légèrement acide favoriserait, en revanche, la complexation du 5-FU neutre avec le complexe $\text{Cu}(\text{PEI})_4^{2+}$ ou $\text{Cu}(\text{PEI})_5^{2+}$.

La présence d'un milieu intraliposomal gélifié diminue la fuite des PA encapsulés. C'est le cas du Caelyx[®] préparé par la technique d'encapsulation par gradient de sulfate ou gradient de pH, qui fait que la doxorubicine se retrouve à l'intérieur des liposomes sous forme gélifiée à base de cristaux formés de sulfate (SO_4^{2-}) et de la doxorubicine protonée (doxH^+). Cette technique a permis d'obtenir une rétention importante de la doxorubicine *in vitro* et *in vivo* même après extravasation dans la MEC tumorale (Charrois *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005; Laginha *et al.*, 2005). A savoir, la demi-vie de libération *in vivo* de la doxorubicine à partir du Caelyx[®] a été rapportée de 315 heures (~13 jours) (Allen *et al.*, 2005). En plus, les essais cliniques ont démontré que le Caelyx[®] libère moins de 10% de la doxorubicine encapsulée en 24 h après administration par voie IV (Laginha *et al.*, 2005). Cette technique d'encapsulation peut être appliquée à une variété de bases faibles, alors que les acides faibles peuvent être chargés d'une manière analogue en utilisant un gradient d'acétate de calcium (Cullis *et al.*, 1997). L'inconvénient de cette dernière méthode est néanmoins qu'elle génère un pH intraliposomal très élevé et défavorable. En fait, le 5-FU est hydrolysé dans ces conditions

basiques, les esters d'acides gras sont aussi sensibles à la fois à l'hydrolyse acide et basique (Lemaire *et al.*, 1992; Grit *et al.*, 1993) donnant formation à des lysolipides qui déstabilisent la bicouche.

Une approche qui mérite d'être testée consisterait à encapsuler le 5-FU par la méthode du gradient de sulfate à l'intérieur de liposomes préformés encapsulant le complexe Cu-PEI en présence d'une solution de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figure 4). Le film serait hydraté d'abord par une solution du complexe Cu-PEI dans $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Le 5-FU sera ensuite incubé avec ces liposomes. L'activité anticancéreuse du complexe ternaire démontrée dans ce travail ne dispense pas d'évaluer l'efficacité cytotoxique du complexe $[\text{5-FU-Cu-PEI}]\text{SO}_4$.

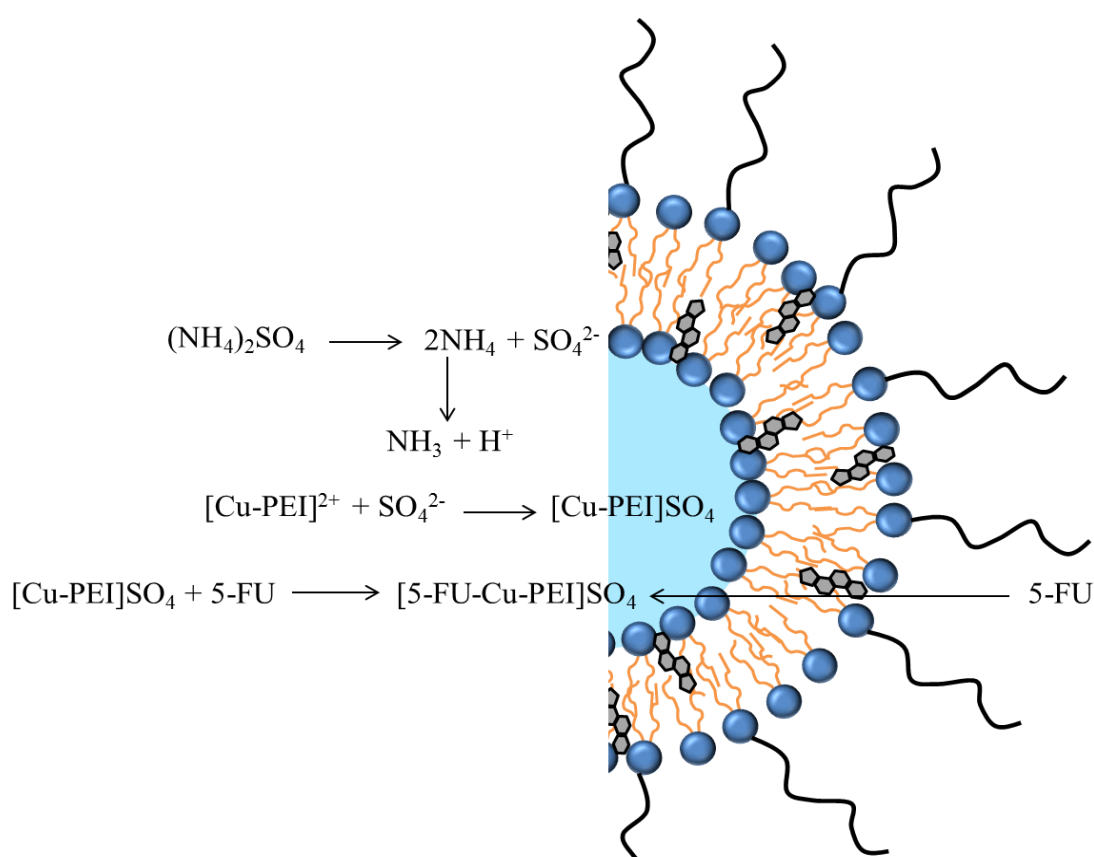


Figure 4. Technique hypothétique d'encapsulation du complexe 5-FU-Cu-PEI par gradient de sulfate.

4. Libération du 5-FU déclenchée par les ultrasons focalisés

Les paramètres acoustiques appropriés pour stimuler la libération du contenu de nos LTST ont été mis au point par notre équipe partenaire UMR Inserm U930 de l'université François-Rabelais de Tours en France. Les paramètres des ondes de FUS sinusoïdales qui induisent une HT à la tache focale avoisinant 48°C sont : des impulsions de tonalité (en anglais tone burst)

centré à 1 MHz répété avec une fréquence fixe de répétition des impulsions de 1 KHz, un rapport cyclique de 40% et un pic de pression négative de 1,75 MPa pendant une durée de 10 min. En raison de la taille de la tache focale (4 mm²), ces conditions sont indispensables pour induire une augmentation de température supérieure à 41°C dans un volume adéquat de l'échantillon de liposomes. En conséquence, la température de l'échantillon équivaut à 42°C. Cette HT est classée dans la catégorie des HT modérées, cliniquement acceptables et facilement atteignables (Mills and Needham, 2005; Grüll and Langereis, 2012), et les LTS qui répondent à une telle température sont avantageusement recherchés.

L'exposition des 5-FU-LTST à ces conditions acoustiques déclenche la libération de 67% de 5-FU, alors que les 5-FU-LNTS ne répondent qu'avec une faible libération de 26% (chapitre 2). En dépit de cette faible libération à 42°C à partir des 5-FU-LNTS, le pourcentage de 5-FU libéré à partir des 5-FU-LTST demeure supérieur d'un facteur trois environ. On note que la libération à partir des 5-FU-LNTS à 1,75 MPa ($25,9 \pm 6,1\%$) qui est plus importante que celle obtenue à 42°C dans un bain-marie ($20,6 \pm 0,9\%$), pourrait être attribuée à la rupture de la bicouche par effet mécanique des FUS à haute pression (i.e. > 1,5 MPa) (chapitre 1).

Il est intéressant de signaler que la libération à partir des 5-FU-LTST sous l'effet de FUS à 1,75 MPa est incomplète (67%), mais ce résultat est, cependant, en bon accord avec ceux obtenus avec la calcéine (50%) (chapitre 1) ainsi que les précédents travaux *in vitro*. A l'aide du même dispositif ultrasonore, une libération maximale d'environ 50% et 80% a été atteinte lorsque les LTST encapsulant la calcéine (Novell *et al.*, 2012) et la doxorubicine (Escoffre *et al.*, 2013) ont été évalués, respectivement. Dans une étude récente, une libération maximale de calcéine de 60% a été obtenue sous FUS en utilisant des liposomes modifiés avec un polymère thermosensible (Ninomiya *et al.*, 2014). Toutefois, dans cette étude, la libération de calcéine a été uniquement attribuée à l'effet mécanique des ultrasons, étant donné que cet essai a été réalisé dans un bain d'eau (aucune élévation de température suffisante n'est mesurée dans l'eau).

En outre, la modélisation de la libération de PA à partir des LTS sous l'effet d'une HT induite par les FUS, correspond à une cinétique de premier ordre qui dépend du temps d'application des ultrasons ainsi que du gradient de concentration du PA entre le milieu intraliposomal et le milieu extraliposomal (Schroeder *et al.*, 2007). Cela soutient l'hypothèse de formation transitoire de domaines defectueux de type pore-like au niveau de la bicouche sous l'effet des FUS à travers lesquels le PA est libéré.

La finalité du concept des LTS est une libération efficace et rapide au niveau de la tumeur cible. Comparativement aux résultats *in vitro*, la libération *in vivo* peut être plus importante en raison de la présence d'enzymes matricielles notamment les phospholipases qui contribuent à

la déstabilisation des LTS, ainsi que la clairance tissulaire (en anglais « washout »). De plus, malgré la présence de PEG à la surface de LTS, l'adsorption de protéines plasmatiques favorise la perméabilité de la bicouche aux composés hydrophiles et pourrait ainsi augmenter la libération sous HT.

Le pourcentage de PA libéré à partir des LTS en réponse à une HT induite par les FUS dépend non seulement des conditions acoustiques (i.e. la pression acoustique, le temps d'exposition, l'intervalle de temps de l'HT) mais également de plusieurs facteurs tels que les propriétés des LTS (i.e. la composition et la phase physique de la bicouche, l'EE du PA, la concentration plasmatique des LTS, la cinétique de libération du PA) ainsi que des propriétés du tissu tumoral (i.e. le système vasculaire tumoral, la perfusion tumorale). L'impact de ces facteurs est résumé dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1. Récapitulatif des facteurs physiques, chimiques et biologiques influençant l'efficacité de libération sous HT induite par des FUS.

Facteur	Elément (s) responsable (s)	Impact sur la libération	Phénomène sous-jacent
<i>Composition de la bicouche</i>	PEG	Accroissement	Absorption et concentration de l'énergie ultrasonore par les groupements de PEG hydratés à la surface des liposomes (Lin and Thomas, 2004; Pong <i>et al.</i> , 2006)
<i>Composition de la bicouche</i>	Toute molécule déstabilisant la bicouche (i.e. phospholipides insaturés, tensioactifs)	Accroissement	Affaiblissement des interactions de Van der Waals entre les chaînes acyles, ce qui augmente le volume libre et rend la bicouche lipidique plus sensible aux contraintes mécaniques induites par les FUS (Pong <i>et al.</i> , 2006)
<i>Etat physique de la bicouche</i>	Transition de phase gel-cristal liquide	Accroissement	Augmentation de l'absorption de l'énergie ultrasonore par la bicouche lipidique à la T_m (Schroeder <i>et al.</i> , 2009)
<i>Taille des LTS</i>	Diamètre	Inversement proportionnel à la taille	Augmentation de la courbure de la bicouche lipidique lorsque les LTS diminuent de taille ce qui favorise la formation des régions de défauts d'assemblage ^a où la perméabilité aux composés hydrophiles se trouve accrue (Hossann <i>et al.</i> , 2010)
<i>Stabilité des LTS</i>	EE du PA au niveau tumoral	Proportionnel à l'EE	Une bonne rétention du PA à 37°C permet d'avoir une concentration élevée du PA encapsulé au niveau tumoral (Schroeder <i>et al.</i> , 2009)
<i>Propriétés du tissu tumoral</i>	-Perfusion tumorale -Effet EPR	Proportionnel à la perfusion et l'EE	Une accumulation ^b importante des LTS dans la tumeur permet une libération quantitative du PA (Grüll and Langereis, 2012)

^aLe nombre des régions de défauts d'assemblage augmente significativement pour des liposomes de taille inférieure à 150 nm (Hatzakis *et al.*, 2009).

^bL'accumulation et la rétention du PA dans le tissu tumoral doivent être importantes afin de vaincre le phénomène de clairance en aval. Une perfusion très élevée peut conduire à une diminution de l'accumulation des LTS dans la tumeur.

5. Devenir des 5-FU-LTST et des 5-FU-LNTS *in vivo*

L'étude pharmacocinétique des 5-FU-LTST et des 5-FU-LNTS en comparaison avec une solution de 5-FU injectés par voie IV à la dose de 22 mg 5-FU/kg chez la souris porteuse d'un modèle de tumeur colorectale HT-29 xénotransplantée a été réalisée.

Les liposomes que nous avons fabriqués sont des suspensions bleues en raison de la présence du complexe Cu-PEI dans leurs cavités aqueuses. Suite à l'injection IV lente des liposomes, la queue des souris se colore en bleu et cette coloration persiste plus ou moins longtemps jusqu'au sacrifice de l'animal (Figure 5).



Figure 5. Coloration bleue de la queue et de la partie inférieure unilatérale du corps des souris suite à l'injection par voie IV des 5-FU-LTST et des 5-FU-LNTS.

Egalement, la queue prend une coloration blanche suite à l'injection de la solution de 5-FU. Cette coloration bleue ou blanche de la queue indique qu'une partie des liposomes ou du 5-FU s'accumulait dans la veine de la queue des souris et rejoignait progressivement la circulation systémique. Les conséquences à ce phénomène sont doubles. D'abord, une réduction de la dose du PA dans le sang, mais aussi un effet « réservoir » au niveau de la veine de la queue qui est à l'origine de la partie croissante des courbes de pharmacocinétique, ainsi que le décalage des temps nécessaires pour atteindre la concentration plasmatique maximale du 5-FU (T_{max}) des différentes formulations : 0,25 h, 0,5 h et 0,25 h pour la solution du 5-FU, les 5-FU-LTST et les 5-FU-LNTS, respectivement. Ce phénomène est probablement lié à l'hyperosmolalité et la viscosité de la solution et des suspensions injectées (888 mM dextrose).

Comparativement à la solution de 5-FU, l'exposition de l'organisme, évaluée par les AUC_{0-24h} , est 1,9 et 2,9 fois plus élevée lorsque le 5-FU est administré sous forme encapsulée à l'intérieur des LTST et LNTS, respectivement (chapitre 3). En outre, les 5-FU-LTST et les 5-FU-LNTS prolongent la demi-vie plasmatique de distribution ($t_{1/2\alpha}$) du 5-FU jusqu'à 0,6 h (36 min) et 0,64 h (38 min), respectivement, en comparaison avec la solution de 5-FU (26 min). Ces résultats sont cohérents avec la littérature sur la prolongation du temps de circulation des PA encapsulés à l'intérieur des liposomes par rapport à la forme libre, même si pour d'autres molécules comme la doxorubicine (Caelyx[®]) on observe des temps de demi-vie beaucoup plus longs sûrement en raison de la meilleure rétention du PA dans les liposomes (Allen and Cullis,

2004). L'étude de distribution tumorale a montré une augmentation significative de l'accumulation des 5-FU-LNTS dans la tumeur en comparaison avec le 5-FU libre (facteur deux). Néanmoins, aucune accumulation plus élevée des 5-FU-LTST n'a été détectée malgré leur circulation plus longue dans le sang par rapport à la solution de 5-FU. En outre, au-delà d'une heure après injection, les résultats de pharmacocinétique ont montré l'absence de différence significative des concentrations plasmatiques de 5-FU entre la solution et les LTST. Ces résultats suggèrent une instabilité plasmatique des 5-FU-LTST qui pourrait être attribuée à leur faible contenu en CHOL (Gaber *et al.*, 1995; Semple *et al.*, 1996; Needham and Dewhirst, 2001). Afin de confirmer si la diminution de la concentration plasmatique de 5-FU est due à une fuite du 5-FU à 37°C, ou à une clairance des liposomes de la circulation sanguine, suite à leur capture par le SPM par exemple, l'étude de la stabilité *in vivo* des 5-FU-LTST aurait été judicieuse. Le double marquage des liposomes avec en l'occurrence, le $^3\text{[H]}$ -cholesteryl hexadécyl ester (CHE) en tant que marqueur non échangeable de la bicouche, et le $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{-5-FU}$ permettrait de mesurer le ratio 5-FU : lipides au cours du temps en comparaison avec le ratio initial et de répondre par la suite à la question de stabilité plasmatique.

La clairance rapide du 5-FU a été mise en évidence dans notre étude *in vivo*. Même le 5-FU encapsulé a été éliminé à des temps relativement courts. En l'occurrence, de l'urine bleue a été visualisée chez certaines souris 15 min après injection. En fait, le 5-FU est connu pour subir un catabolisme rapide dans la première heure suivant l'injection par voie IV, ainsi qu'une excrétion rénale de 60 à 90% de la dose administrée dans les 24 h suivant l'injection, essentiellement sous forme de alpha-fluoro-bêta-alanine (Heggie *et al.*, 1987). En vue d'évaluer l'excrétion rénale du 5-FU encapsulé sous forme de complexe ternaire dans les LTST et les LNTS, une collecte de l'urine serait possible en hébergeant les souris dans des cages à métabolisme. En outre, afin de déterminer si le 5-FU sort prématurément des liposomes sous forme libre ou complexée, il serait intéressant d'injecter une solution du complexe ternaire 5-FU-Cu-PEI et de comparer sa pharmacocinétique à celles du 5-FU libre et du 5-FU encapsulé.

Cette étude nous a cependant permis d'aboutir à notre objectif principal en déterminant le temps optimal pour une application des FUS en vue de déclencher la libération intratumorale du 5-FU encapsulé. Ce temps correspond au T_{\max} et est atteint 0,5 h (30 min) post injection. Enfin, à notre connaissance, notre étude constitue la première qui a évalué le devenir des LTST furtifs encapsulant le 5-FU *in vivo*. Nos résultats sont encourageants pour tester l'efficacité antitumorale des 5-FU-LTST en combinaison avec les FUS chez la souris. Cette étude sera réalisée en collaboration avec deux partenaires du projet ANR-2010-TecSan-007 : l'UMR Inserm U930 et l'unité Inserm U948.

Références

- Al-Jamal, W. T., Al-Ahmady, Z. S. and Kostarelos, K. (2012). "Pharmacokinetics & tissue distribution of temperature-sensitive liposomal doxorubicin in tumor-bearing mice triggered with mild hyperthermia." Biomaterials **33**(18): 4608-4617.
- Allen, C., Dos Santos, N., Gallagher, R., Chiu, G. N. C., Shu, Y., Li, W. M., Johnstone, S. A., Janoff, A. S., Mayer, L. D., Webb, M. S. and Bally, M. B. (2002). "Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol)." Bioscience Reports **22**(2): 225-250.
- Allen, T. M. (1981). "A study of phospholipid interactions between high-density lipoproteins and small unilamellar vesicles." Biochimica Et Biophysica Acta **640**(2): 385-397.
- Allen, T. M. and Cullis, P. R. (2004). "Drug delivery systems: Entering the mainstream." Science **303**(5665): 1818-1822.
- Allen, T. M., Mumbengegwi, D. R. and Charrois, G. J. R. (2005). "Anti-CD19-Targeted Liposomal Doxorubicin Improves the Therapeutic Efficacy in Murine B-Cell Lymphoma and Ameliorates the Toxicity of Liposomes with Varying Drug Release Rates." Clinical Cancer Research **11**(9): 3567-3573.
- Alvarez, P., Marchal, J. A., Boulaiz, H., Carrillo, E., Velez, C., Rodriguez-Serrano, F., Melguizo, C., Prados, J., Madeddu, R. and Aranega, A. (2012). "5-Fluorouracil derivatives: a patent review." Expert Opinion on Therapeutic Patents **22**(2): 107-123.
- Banno, B., Ickenstein, L. M., Chiu, G. N. C., Bally, M. B., Thewalt, J., Brief, E. and Wasan, E. K. (2010). "The Functional Roles of Poly(Ethylene Glycol)-Lipid and Lysolipid in the Drug Retention and Release from Lysolipid-Containing Thermosensitive Liposomes In Vitro and In Vivo." Journal of Pharmaceutical Sciences **99**(5): 2295-2308.
- Borkovec, M. and Koper, G. J. M. (1997). "Proton Binding Characteristics of Branched Polyelectrolytes." Macromolecules **30**(7): 2151-2158.
- Bozkir, A. and Saka, O. M. (2005). "Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies." Il Farmaco **60**(10): 840-846.
- Charrois, G. J. R. and Allen, T. M. (2004). "Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1663**(1-2): 167-177.
- Cullis, P. R., Hope, M. J., Bally, M. B., Madden, T. D., Mayer, L. D. and Fenske, D. B. (1997). "Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes **1331**(2): 187-211.
- Elorza, B., Elorza, M. A., Frutos, G. and Chantres, J. R. (1993). "Characterization of 5-Fluorouracil loaded liposomes prepared by reverse-phase evaporation or freezing-thawing extrusion methods - Study of drug-release " Biochimica Et Biophysica Acta **1153**(2): 135-142.

- Escoffre, J. M., Novell, A., de Smet, M. and Bouakaz, A. (2013). "Focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: in-vitro characterization and validation." Physics in Medicine and Biology **58**(22): 8135-8151.
- Fresta, M., Villari, A., Puglisi, G. and Cavallaro, G. (1993). "5-Fluorouracil: various kinds of loaded liposomes: encapsulation efficiency, storage stability and fusogenic properties." International Journal of Pharmaceutics **99**(2–3): 145-156.
- Gaber, M. H., Hong, K. L., Huang, S. K. and Papahadjopoulos, D. (1995). "Thermosensitive sterically stabilized liposomes - Formulation and in-vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma." Pharmaceutical Research **12**(10): 1407-1416.
- Gabizon, A., Catane, R., Uziely, B., Kaufman, B., Safra, T., Cohen, R., Martin, F., Huang, A. and Barenholz, Y. (1994). "Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in Malignant Exudates of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-glycol Coated Liposomes." Cancer Research **54**(4): 987-992.
- Glavas-Dodov, M., Fredro-Kumbaradzi, E., Goracinova, K., Simonoska, M., Calis, S., Trajkovic-Jolevska, S. and Hincal, A. A. (2005). "The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU." International Journal of Pharmaceutics **291**(1–2): 79-86.
- Grit, M., Underberg, W. J. M. and Crommelin, D. J. A. (1993). "Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions." Journal of Pharmaceutical Sciences **82**(4): 362-366.
- Grüll, H. and Langereis, S. (2012). "Hyperthermia-triggered drug delivery from temperature-sensitive liposomes using MRI-guided high intensity focused ultrasound." Journal of Controlled Release **161**(2): 317-327.
- Hatzakis, N. S., Bhatia, V. K., Larsen, J., Madsen, K. L., Bolinger, P. Y., Kunding, A. H., Castillo, J., Gether, U., Hedegard, P. and Stamou, D. (2009). "How curved membranes recruit amphipathic helices and protein anchoring motifs." Nature Chemical Biology **5**(11): 835-841.
- Heggie, G. D., Sommadossi, J.-P., Cross, D. S., Huster, W. J. and Diasio, R. B. (1987). "Clinical Pharmacokinetics of 5-Fluorouracil and Its Metabolites in Plasma, Urine, and Bile." Cancer Research **47**(8): 2203-2206.
- Hossann, M., Wang, T., Wiggenhorn, M., Schmidt, R., Zengerle, A., Winter, G., Eibl, H., Peller, M., Reiser, M., Issels, R. D. and Lindner, L. H. (2010). "Size of thermosensitive liposomes influences content release." Journal of Controlled Release **147**(3): 436-443.
- Kaiser, N., Kimpfler, A., Massing, U., Burger, A. M., Fiebig, H. H., Brandl, M. and Schubert, R. (2003). "5-Fluorouracil in vesicular phospholipid gels for anticancer treatment: entrapment and release properties." International Journal of Pharmaceutics **256**(1–2): 123-131.
- Kheiriloom, A., Lai, C.-Y., Tam, S. M., Mahakian, L. M., Ingham, E. S., Watson, K. D. and Ferrara, K. W. (2013). "Complete regression of local cancer using temperature-sensitive liposomes combined with ultrasound-mediated hyperthermia." Journal of Controlled Release **172**(1): 266-273.

- Laginha, K. M., Verwoert, S., Charrois, G. J. R. and Allen, T. M. (2005). "Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors." Clinical Cancer Research **11**(19): 6944-6949.
- Lemaire, L., Malet-Martino, M. C., de Forni, M., Martino, R. and Lasserre, B. (1992). "Cardiotoxicity of commercial 5-fluorouracil vials stems from the alkaline hydrolysis of this drug." British journal of cancer **66**(1): 119-127.
- Li, L., ten Hagen, T. L. M., Schipper, D., Wijnberg, T. M., van Rhooen, G. C., Eggermont, A. M. M., Lindner, L. H. and Koning, G. A. (2010). "Triggered content release from optimized stealth thermosensitive liposomes using mild hyperthermia." Journal of Controlled Release **143**(2): 274-279.
- Lin, H.-Y. and Thomas, J. L. (2004). "Factors Affecting Responsivity of Unilamellar Liposomes to 20 kHz Ultrasound." Langmuir **20**(15): 6100-6106.
- Lindner, L. H., Eichhorn, M. E., Eibl, H., Teichert, N., Schmitt-Sody, M., Issels, R. D. and Dellian, M. (2004). "Novel Temperature-Sensitive Liposomes with Prolonged Circulation Time." Clinical Cancer Research **10**(6): 2168-2178.
- Mills, J. K. and Needham, D. (2005). "Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1716**(2): 77-96.
- Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., Ando, T., Yazaki, N., Watanabe, K., Haneda, S., Shibata, C. and Sasaki, I. (2010). "5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs." Cancers **2**(3): 1717-1730.
- Moghim, S. M., Andersen, A. J., Hashemi, S. H., Lettieri, B., Ahmadvand, D., Hunter, A. C., Andresen, T. L., Hamad, I. and Szebeni, J. (2010). "Complement activation cascade triggered by PEG-PL engineered nanomedicines and carbon nanotubes: The challenges ahead." Journal of Controlled Release **146**(2): 175-181.
- Needham, D. and Dewhirst, M. W. (2001). "The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors." Advanced Drug Delivery Reviews **53**(3): 285-305.
- Ninomiya, K., Kawabata, S., Tashita, H. and Shimizu, N. (2014). "Ultrasound-mediated drug delivery using liposomes modified with a thermosensitive polymer." Ultrasonics Sonochemistry **21**(1): 310-316.
- Novell, A., Escoffre, J. M., Al-Sabbagh, C., Mannaris, C., Fattal, E., Tsapis, N., Averkiou, M. and Bouakaz, A. (2012). Role of thermal and mechanical effects on drug release from thermosensitive nanocarriers. Ultrasonics Symposium (IUS), 2012 IEEE International.
- Ozer, A. Y. and Talsma, H. (1989). "Preparation and stability of liposomes containing 5-fluorouracil." International Journal of Pharmaceutics **55**(2-3): 185-191.
- Perrine, T. D. and Landis, W. R. (1967). "Analysis of polyethylenimine by spectrophotometry of its copper chelate." Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry **5**(8): 1993-2003.

Pong, M., Umchid, S., Guarino, A. J., Lewin, P. A., Litniewski, J., Nowicki, A. and Wrenn, S. P. (2006). "In vitro ultrasound-mediated leakage from phospholipid vesicles." Ultrasonics **45**(1-4): 133-145.

Schroeder, A., Avnir, Y., Weisman, S., Najajreh, Y., Gabizon, A., Talmon, Y., Kost, J. and Barenholz, Y. (2007). "Controlling Liposomal Drug Release with Low Frequency Ultrasound: Mechanism and Feasibility." Langmuir **23**(7): 4019-4025.

Schroeder, A., Kost, J. and Barenholz, Y. (2009). "Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes." Chemistry and Physics of Lipids **162**(1-2): 1-16.

Semple, S. C., Chonn, A. and Cullis, P. R. (1996). "Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes." Biochemistry **35**(8): 2521-2525.

Semple, S. C., Chonn, A. and Cullis, P. R. (1996). "Influence of Cholesterol on the Association of Plasma Proteins with Liposomes†." Biochemistry **35**(8): 2521-2525.

Ta, T. and Porter, T. M. (2013). "Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy." Journal of Controlled Release **169**(1-2): 112-125.

Tagami, T., Ernsting, M. J. and Li, S.-D. (2011). "Efficient tumor regression by a single and low dose treatment with a novel and enhanced formulation of thermosensitive liposomal doxorubicin." Journal of Controlled Release **152**(2): 303-309.

Thomas, A. M., Kapanen, A. I., Hare, J. I., Ramsay, E., Edwards, K., Karlsson, G. and Bally, M. B. (2011). "Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-Fluorouracil for parenteral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy." Journal of Controlled Release **150**(2): 212-219.

von Zelewsky, A., Barbosa, L. and Schlöpfer, C. W. (1993). "Poly(ethylenimines) as Brønsted bases and as ligands for metal ions." Coordination Chemistry Reviews **123**(1-2): 229-246.

Yatvin, M. B., Weinstein, J. N., Dennis, W. H. and Blumenthal, R. (1978). "Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia " Science **202**(4374): 1290-1293.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons conçu deux modèles de liposomes : des LTST et des LNTS. Les deux types de liposomes possèdent la même composition lipidique. La modification du pourcentage de CHOL nous a permis d'ajuster la propriété de thermosensibilité de la bicouche, et ainsi prouver la réponse différente des liposomes à une HT modérée induite par des FUS.

En effet, au cours des études que nous avons réalisées, nous avons montré que les liposomes composés de 5 mol% de CHOL sont thermosensibles alors que l'inclusion de 30 mol% de CHOL abolit la thermosensibilité des liposomes. De plus, nous avons mis au point les paramètres ultrasonores adéquats à la génération d'une HT équivalente à la T_m de la bicouche de nos LTST (42°C). Nos résultats suggèrent que pour des pressions acoustiques élevées (> 1,5 MPa), les FUS génèrent, en plus de l'effet thermique, une contrainte mécanique sur les liposomes améliorant ainsi la libération de leur contenu. D'autre part, nous avons optimisé l'EE d'un PA anticancéreux hydrophile, le 5-FU, grâce à une stratégie de complexation avec le Cu et la PEI, et ainsi obtenu une EE suffisamment élevée pour envisager une application thérapeutique *in vivo*. Nous avons démontré ensuite que les 5-FU-LTST développés rassemblent au sein d'une seule formulation les avantages des LTST (stabilité à 37°C) et ceux des LTSL : soit une T_m dans la gamme des températures modérées (Kong *et al.*, 2001; Hildebrandt *et al.*, 2002; Mills and Needham, 2005) cliniquement atteignables, et une cinétique de libération rapide et efficace. Nous rappelons que les formulations de LTST présentent normalement une T_m pouvant aller jusqu'à 45°C. L'évaluation de la cytotoxicité des 5-FU-LTST et des 5-FU-LNTS a révélé que la toxicité émane du 5-FU et non pas des excipients. En outre, l'encapsulation du complexe 5-FU-Cu-PEI dans les LTST induit une diminution de la CI_{50} . Nous avons également démontré que les 5-FU-LTST et les 5-FU-LNTS augmentent l'exposition de l'organisme au 5-FU chez la souris porteuse d'un modèle de tumeur colorectale xénogreffée. De plus, les liposomes prolongent la demi-vie plasmatique du 5-FU ce qui favorise le ciblage passif de la tumeur. L'étude de biodistribution a montré une accumulation tumorale des 5-FU-LNTS plus importantes comparée à la solution du 5-FU. D'autre part, ces différentes études soulignent également le fait que des différences existent *in vitro* et *in vivo*, et qu'elles fournissent des résultats complémentaires afin d'obtenir des informations solides concernant les propriétés des LTST.

Différents types de perspectives peuvent être envisagées à ce travail.

Dans un premier temps, et ce à très court terme, nous avons prévu de suivre la croissance tumorale chez la souris porteuse d'un modèle de tumeur colorectale xénogreffée suite à l'administration des 5-FU-LTST et des 5-FU-LNTS en présence et en absence d'une HT locale induite par des FUS.

D'autre part, plusieurs caractérisations et optimisations des modèles de LTST et LNTS peuvent être envisagées :

La caractérisation du complexe 5-FU-Cu-PEI permettrait de mieux comprendre la structure chimique de ce dernier. En effet, une grande variété de complexes de coordination peut être obtenue en faisant varier la stœchiométrie entre la PEI, le Cu et le 5-FU (von Zelewsky *et al.*, 1993). Le complexe pourrait être étudié par analyse élémentaire du carbone, azote et hydrogène afin de connaître la composition en éléments chimiques du complexe. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier permettrait de savoir s'il y a complexation ou non par comparaison du spectre du ligand libre avec celui du complexe obtenu. La complexation provoque le déplacement de certaines bandes. La spectroscopie RMN fournirait de plus amples informations concernant la composition des complexes. La diffraction des rayons X sur poudre permettrait d'identifier la structure du complexe.

- L'étude des voies d'endocytose impliquées dans l'internalisation des liposomes dans les cellules du carcinome colorectal HT-29. Nous avons démontré au cours de ces études, que l'encapsulation du complexe 5-FU-Cu-PEI dans les LTST induit une diminution de la CI_{50} et que cette cytotoxicité n'est due qu'au 5-FU. En conséquence, il serait intéressant d'incuber les cellules 30 min à 37°C avec l'un des inhibiteurs pharmacologiques de l'endocytose (azoture de sodium, poly-lysine, colchicine, chlorpromazine, filipine...) avant l'addition des liposomes marqués par un fluorophore, et d'évaluer l'internalisation cellulaire par cytométrie de flux. Ces inhibiteurs sont à coupler entre eux vu que la majorité des vecteurs empruntent plus d'une voie d'endocytose, et qu'aucun inhibiteur n'est parfaitement spécifique d'une voie (Sahay *et al.*, 2010; Mei *et al.*, 2014).
- L'étude de l'activation du système du complément *in vitro* permettrait de prédire à priori le comportement et la stabilité des 5-FU-LTST et des 5-FU-LNTS dans le sang. Les liposomes pourraient être incubés avec du sérum humain (donneur sain) dans un ratio volumique 1:4 (3 mg lipides/ml) à 37°C pendant 30 min (Moghimi *et al.*, 2006),

et les marqueurs des voies classique (C4d) et alternative (Bb) et SC5b (complexe terminal lié aux protéines S) pourraient être ensuite déterminés.

- La mesure de la taille et du pourcentage de libération du 5-FU en fonction du temps par incubation des 5-FU-LTST et des 5-FU-LNTS au contact de 50% de plasma humain à 37°C (Gaber *et al.*, 1995) afin d'estimer la stabilité sérique des liposomes
- La validation des modèles de LTST et LNTS par encapsulation d'autres PA anticancéreux. Les PA amphiphiles tels que les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine) et les alcaloïdes de la pervenche (vincristine, vinblastine, vinorelbine) semblent être les plus prometteurs pour une encapsulation stable à l'intérieur des liposomes (Drummond *et al.*, 1999) et ce grâce au développement de la technique d'encapsulation par gradient d'ammonium qui a donné des résultats satisfaisants. Cela permettrait d'ajuster la libération de ces PA de sorte à maintenir la stabilité des liposomes dans le sang, tout en permettant au PA d'être libéré au niveau de la tumeur.
- L'encapsulation d'une prodrogue de 5-FU ayant une MM plus importante. De nombreuses prodrogues lipophiles (Sun *et al.*, 2008; Semakov *et al.*, 2013) et hydrophiles (Tam *et al.*, 2008) de 5-FU ont été décrites dans la littérature. L'encapsulation de molécules lipophiles au sein de la bicouche des LTST pourrait modifier la T_m de cette dernière, et imposer ainsi de sortir de la gamme de température modérée. En revanche, l'encapsulation de prodrogues hydrophiles de 5-FU dans la cavité aqueuse des LTST permet de contourner ce verrou. L'inconvénient majeur à l'administration de prodrogues est la corrélation de leur efficacité à l'activité de l'enzyme activant et l'implication incontestable des facteurs génétiques dans cette activité enzymatique. Une stratégie innovante serait l'administration simultanée de deux LTST, l'un encapsulant la prodrogue et l'autre l'enzyme associée. La prodrogue et l'enzyme seraient libérées dans la tumeur en réponse à l'HT induite par les FUS. Cependant on pourra noter que vu la MM des prodrogues, le taux de charge de ces liposomes risque d'être faible.
- Le développement de 5-FU-LTST à ciblage actif. La fonctionnalisation des 5-FU-LTST avec de l'acide hyaluronique de MM élevée (Peer and Margalit, 2004) ou des aptamères (Xing *et al.*, 2013) permettrait d'augmenter leur sensibilité vis-à-vis des cellules colorectales tumorales qui surexpriment le récepteur membranaire « cluster of differentiation 44 » ou CD44 (Visvader and Lindeman, 2008). En conséquence, la prépondérance de l'internalisation cellulaire sur le phénomène de clairance tissulaire

permettrait d'augmenter la concentration des liposomes à l'intérieur des cellules. La libération du 5-FU en réponse aux FUS à partir des 5-FU-LTST internalisés se trouverait amplifiée.

- L'incorporation d'un lysolipide de type MSPC permettrait de bénéficier d'une propriété de libération ultrarapide avantageusement favorable à surmonter la clairance sanguine rapide en aval (Needham *et al.*, 2013).

Enfin, dans le cadre du projet Theranos ANR-2010-TecSan-007, l'objectif est double : concevoir une plateforme ultrasonore mixte de thérapie (1-5 MHz)/imagerie (20 MHz) développée sur un seul substrat, et élaborer de nouveaux protocoles adaptés à l'activation et la libération par ultrasons de liposomes. La mise au point d'une sonde de type cMUT (Capacitive Micromachined Ultrasonic Transducer) à double fonction : générer des FUS de basse fréquence et des FUS de haute fréquence, est en cours (sociétés Vermon SA et CEA/LETI). Ce type de sonde offrira plusieurs modalités de suivi des zones traitées localement : soit par de l'imagerie échographique native, soit par de l'imagerie de contraste haute résolution après administration de microbulles. L'achèvement de la conception de cette sonde permettrait de valider le système composé de 5-FU-LTST et FUS en pré-clinique. L'application des FUS de basse fréquence après administration des 5-FU-LTST et 5-FU-LNTS visera à une libération intratumorale ciblée. Tandis que les FUS de haute fréquence, en association avec les microbulles de gaz serviront à l'imagerie en temps réel de haute résolution.

Références

- Drummond, D. C., Meyer, O., Hong, K. L., Kirpotin, D. B. and Papahadjopoulos, D. (1999). "Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors." Pharmacological Reviews **51**(4): 691-743.
- Gaber, M. H., Hong, K. L., Huang, S. K. and Papahadjopoulos, D. (1995). "Thermosensitive sterically stabilized liposomes - Formulation and in-vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma." Pharmaceutical Research **12**(10): 1407-1416.
- Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T., Felix, R. and Riess, H. (2002). "The cellular and molecular basis of hyperthermia." Critical Reviews in Oncology/Hematology **43**(1): 33-56.
- Kong, G., Braun, R. D. and Dewhirst, M. W. (2001). "Characterization of the Effect of Hyperthermia on Nanoparticle Extravasation from Tumor Vasculature." Cancer Research **61**(7): 3027-3032.
- Mei, L., Fu, L., Shi, K., Zhang, Q., Liu, Y., Tang, J., Gao, H., Zhang, Z. and He, Q. (2014). "Increased tumor targeted delivery using a multistage liposome system functionalized with RGD, TAT and cleavable PEG." International Journal of Pharmaceutics **468**(1-2): 26-38.
- Mills, J. K. and Needham, D. (2005). "Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1716**(2): 77-96.
- Moghim, S. M., Hamad, I., Andresen, T. L., Jørgensen, K. and Szebeni, J. (2006). "Methylation of the phosphate oxygen moiety of phospholipid-methoxy(polyethylene glycol) conjugate prevents PEGylated liposome-mediated complement activation and anaphylatoxin production." The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology **20**(14): 2591-2593.
- Needham, D., Park, J. Y., Wright, A. M. and Tong, J. H. (2013). "Materials characterization of the low temperature sensitive liposome (LTSL): effects of the lipid composition (lysolipid and DSPE-PEG2000) on the thermal transition and release of doxorubicin." Faraday Discussions **161**: 515-534.
- Peer, D. and Margalit, R. (2004). "Tumor-targeted hyaluronan nanoliposomes increase the antitumor activity of liposomal Doxorubicin in syngeneic and human xenograft mouse tumor models." Neoplasia **6**(4): 343-353.
- Sahay, G., Alakhova, D. Y. and Kabanov, A. V. (2010). "Endocytosis of nanomedicines." Journal of Controlled Release **145**(3): 182-195.
- Semakov, A. V., Blinkov, A. A., Gaenko, G. P., Vostrova, A. G. and Molotkovsky, J. G. (2013). "Synthesis and properties of lipophilic derivatives of 5-fluorouracil." Russian Journal of Bioorganic Chemistry **39**(3): 299-305.

- Sun, W., Zhang, N., Li, A., Zou, W. and Xu, W. (2008). "Preparation and evaluation of N3-O-toluyyl-fluorouracil-loaded liposomes." International Journal of Pharmaceutics **353**(1–2): 243-250.
- Tam, J., Mei, Q., Liu, L. and Wang, Q. (2008). Polysaccharide component protects the 5-FU from absorption in the upper gastrointestinal tract, delivers the 5-FU to the colorectal area, Google Patents.
- Visvader, J. E. and Lindeman, G. J. (2008). "Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions." Nature Reviews Cancer **8**(10): 755-768.
- von Zelewsky, A., Barbosa, L. and Schläpfer, C. W. (1993). "Poly(ethylenimines) as Brønsted bases and as ligands for metal ions." Coordination Chemistry Reviews **123**(1–2): 229-246.
- Xing, H., Tang, L., Yang, X., Hwang, K., Wang, W., Yin, Q., Wong, N. Y., Dobrucki, L. W., Yasui, N., Katzenellenbogen, J. A., Helferich, W. G., Cheng, J. and Lu, Y. (2013). "Selective Delivery of an Anticancer Drug with Aptamer-Functionalized Liposomes to Breast Cancer Cells and." Journal of Materials Chemistry B Materials for Biology and Medicine **1**(39): 5288-5297.

Annexe




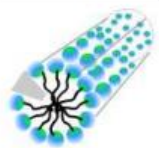

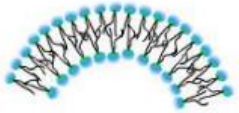
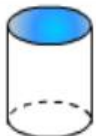


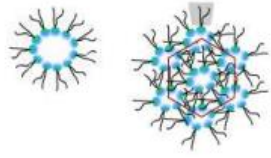
Type de lipides	$P = \frac{v}{a_0 l_c}$	Forme	Structure
Lipides monocaténaires à large tête polaire, surfactant à faible force ionique	$P < 1/3$		Micelles sphériques 
Lipides monocaténaires à petite tête polaire, Surfactant à grande force ionique ou lipides non ioniques	$1/3 < P < 1/2$		Micelles cylindriques 
Lipides bicaténaires à large tête polaire, chaînes fluides PC, PS, PA	$1/2 < P < 1$		Vésicules 
Lipides bicaténaires à petites polaire, lipides anioniques à grande force ionique, chaînes gelées PE, PS + Ca^{2+}	$P \sim 1$		Bicouches planes 
Lipides bicaténaires à petites tête polaire, lipides non ioniques, chaînes poly-cis-insaturées, température élevée PE insaturée, $PA + CA^{2+}$	$P > 1$		Micelles inverse 

Figure 1. Forme et morphologie des auto-assemblages des lipides en fonction de la valeur du paramètre d'empilement P . Adaptée de Delattre *et al.* 1993 (Delattre *et al.* 1993).

Références

Delattre, J., Couvreur, P., Puisieux, F., Philippot, J. R. and Schuber, F. (1993). Les liposomes aspects technologiques biologiques et pharmacologiques. Paris.

◆ Résumé

La conception, la formulation, l'optimisation ainsi que la caractérisation de liposomes thermosensibles encapsulant un principe actif anticancéreux, le 5-Fluorouracile, ont été réalisées. La délivrance déclenchée par des ultrasons focalisés a été étudiée *in vitro*, tandis que le devenir *in vivo* a été évalué chez la souris porteuse de tumeur colorectale HT-29 xénotransplantée.

◆ Mots-clefs

Liposomes thermosensibles, liposomes non thermosensibles, encapsulation passive, 5-Fluorouracile, encapsulation active, complexe cuivre-polyéthylèneimine, ultrasons focalisés, hyperthermie modérée, libération déclenchée.

◆ Laboratoire de rattachement

Institut Galien Paris-Sud

UMR CNRS 8612

PÔLE : PHARMACOTECHNIQUE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR « FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex